

Aus dem Medizinischen Zentrum für Nervenheilkunde
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg
in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,
Standort Marburg - Klinik für Neurologie
Direktor: Prof. Dr. med. W.H. Oertel
Arbeitsgruppe Klinische Neuroimmunologie
Leiter: Prof. Dr. med. Norbert Sommer

**Klonale experimentelle
autoimmune Enzephalomyelitis:
Charakterisierung
myelinspezifischer Antikörper
in einem T_H2-induzierten
adoptiven Transfermodell**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Michael Sieren

aus
Merzig

Marburg 2011

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
am: 17.08.2012

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

<u>Dekan:</u>	Prof. Dr. med. M. Rothmund
<u>Referent:</u>	Prof. Dr. med. N. Sommer
<u>Korreferent:</u>	Prof. Dr. med. M. Lohoff

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung.....	4
2	Summary	6
3	Einleitung	8
3.1	Das Immunsystem.....	8
3.2	Multiple Sklerose	11
3.2.1	Verlaufsformen und Therapie.....	11
3.2.2	Ätiologie und Pathogenese	14
3.2.2.1	Genetik und Umwelteinflüsse.....	14
3.2.2.2	Pathogenetische Heterogenität	15
3.2.2.3	Immunologische Konzepte.....	17
3.3	Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis	18
3.3.1	Limitationen des T _H 1-T _H 2-Paradigmas.....	18
3.3.2	Rolle der humoralen Immunantwort bei der EAE	21
3.3.3	Modell einer T _H 2 induzierten EAE	23
3.4	Fragestellung der vorliegenden Arbeit	26
4	Material und Methoden	27
4.1	Material	27
4.1.1	Versuchstiere.....	27
4.1.2	Antikörper	27
4.1.3	Chemikalien und Substanzen	28
4.1.4	Chromatographiesäulen.....	29
4.1.5	Geräte	29
4.1.6	Lösungen und Puffer	31
4.1.7	Proteine und Peptide	33
4.1.8	Testkits	33
4.1.9	Verbrauchsmaterial.....	33
4.1.10	Zellen.....	34
4.1.10.1	T-Zellen.....	34
4.1.10.2	Myelomzellen	34
4.1.11	Zellkulturmedium und Mediumzusätze	34
4.2	Methoden	36
4.2.1	Etablierung von B-Zell-Hybridomen	36
4.2.1.1	Immunisierungsprotokoll und Etablierung von T-Zelllinien.....	36

4.2.1.2	T-Zellklonierung	36
4.2.1.3	EAE-Induktion durch adoptiven T-Zell-Transfer	37
4.2.1.4	Fusion: Generierung von Hybridomzellen	37
4.2.1.5	Screening und Auswahl von Hybridomzellen	38
4.2.1.6	Gefrierkonservierung von Zellen	39
4.2.1.7	Auftauen	39
4.2.2	Antikörperproduktion mit Hybridomzellkultur	39
4.2.3	Ammoniumsulfatfällung und Dialyse	40
4.2.4	Aufreinigung der murinen monoklonalen Antikörper.....	40
4.2.4.1	Aufreinigung mittels Protein G Affinitätschromatographie.....	40
4.2.4.2	Aufreinigung mittels HiTrap® IgM Affinitätschromatographie	41
4.2.5	Sandwich-ELISA.....	41
4.2.6	Proteinextraktion aus ZNS-Gewebe von SJL-Mäusen	42
4.2.7	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	43
4.2.8	Western Blot (Proteintransfer auf PVDF-Membranen)	43
4.2.9	Immunologischer Nachweis der transferierten Proteine	44
4.2.10	Transferexperimente.....	46
4.2.11	Immunhistochemie.....	46
4.2.12	Statistik.....	46
5	Ergebnisse.....	47
5.1	Aufreinigung monoklonaler PLP 139-151 spezifischer Antikörper.....	47
5.2	Funktionelle Charakterisierung der PLP 139-151 spezifischen Antikörper ...	52
5.2.1	Western Blot	52
5.2.2	Immunhistochemie.....	54
5.2.3	Transferexperimente.....	54
5.2.3.1	Transferexperiment mit Antikörper 24 10	55
5.2.3.2	Transferexperiment mit Antikörper 21 06	56
5.3	Antikörperantwort gegen weitere Myelinpeptide	57
5.3.1	4E6-2 – ein monoklonaler MOG 35-55 spezifischer IgM-Antikörper	58
5.3.2	Western Blot	61
5.3.3	Immunhistochemie.....	62
5.3.4	Klinischer Verlauf nach adoptivem Co-Transfer mit 4E6-2	62
6	Diskussion.....	67
7	Liste der verwendeten Abkürzungen	74
8	Literaturverzeichnis	76

9	Verzeichnis der akademischen Lehrer	98
10	Danksagung.....	99
11	Ehrenwörtliche Erklärung	101
12	Lebenslauf	102

1 Zusammenfassung

Die Multiple Sklerose ist in Europa und Nordamerika die häufigste Entmarkungserkrankung des zentralen Nervensystems. Sie ist neben Inflammation und Demyelinisierung auch durch neurodegenerative Prozesse gekennzeichnet. Hierbei spielen T-Zell-vermittelte Mechanismen eine wesentliche Rolle. Aufgrund der Heterogenität ihres klinischen Verlaufs sind weder individuelle Voraussagen bezüglich der Progression der neurologischen Defizite noch bezüglich des therapeutischen Ansprechens möglich. Diese klinische Heterogenität spiegelt sich in unterschiedlichen histopathologischen sowie liquorzytologischen Mustern wieder. Es finden sich Subtypen, bei denen humorale Effektormechanismen eine wesentliche Rolle zu spielen scheinen.

Die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) ist ein Tiermodell der Multiplen Sklerose und kann in suszeptiblen Tierstämmen durch aktive Immunisierung mit Myelinpeptiden oder durch den adoptiven Transfer myelinspezifischer CD4 positiver T_H1 -Zellen induziert werden. Die EAE galt lange als eine im Wesentlichen T_H1 -vermittelte Erkrankung, während T_H2 -Zellen eher protektive Funktionen zugeschrieben wurden. Dieses T_H1 - T_H2 -Paradigma stellt jedoch eine zu starke Vereinfachung der Immunantwort im Rahmen der EAE-Induktion dar. Zum einen spielen weitere T-Zell-Subpopulationen eine wesentliche Rolle bei der Pathogenese. So gelingt z.B. durch den adoptiven Transfer von T_H17 -Zellen eine sehr effiziente EAE-Induktion auch ohne eine vorherige in vitro Stimulation. Zum anderen kann in einem neuartigen adoptiven T-Zell-Transfermodell durch den Transfer klonaler Proteolipidprotein (PLP) 139-151 spezifischer CD4+ T_H2 -Zellen bei immunkompetenten SJL-Mäusen eine EAE mit chronifizierendem Verlauf induziert werden, deren entzündliche Läsionen in der chronischen Phase durch Infiltrate aus Makrophagen, B-Zellen, Plasmazellen sowie massiven Antikörperablagerungen gekennzeichnet sind. Im Serum der Mäuse ist eine hochtitrige Antikörperantwort gegen PLP139-51 nachweisbar.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist eine nähere Charakterisierung der Antikörperantwort in diesem Modell. Nach EAE-Induktion durch adoptiven Transfer von Zellen des PLP 139-151 spezifischen T_H2 -Zell-Klons 3-3 wurden in der chronischen Phase der Erkrankung Milzzellen entnommen und mit Zellen der Sp2-Maus-Myelom-Zelllinie fusioniert. Hierdurch wurden antikörperproduzierende Hybridomzellen generiert. Durch Klonierung mittels des Limiting-Dilution-Verfahrens und anschließender

chromatograpischer Aufreinigung wurden monoklonale, myelinspezifische Antikörper gewonnen. Deren weitere Charakterisierung erfolgte mittels ELISA, Western-Blot, an Gewebsschnitten sowie in adoptiven Transferexperimenten. Die Besonderheit dieses Modells liegt darin, dass die monoklonalen Antikörper ohne vorherige aktive Immunisierung generiert wurden. *Es handelt sich somit um einen neuen, physiologischen Ansatz zur Charakterisierung der T-Zell-B-Zell-Interaktion bzw. der Rolle von Antikörpern in einem neuen T_H2-induzierten EAE-Modell.*

Im ersten Teil der Arbeit wurden ausgewählte monoklonale PLP139-151 spezifische Antikörper der Isotypen IgG1 sowie IgG2b aufgereinigt. Zwar konnten diese PLP139-151 in einem ELISA binden. Weder in einem Western Blot mit Myelinproteinen noch in Kryo- oder Paraffinschnitten von ZNS-Gewebe zeigte sich hingegen eine spezifische Bindung an Myelin. Der adoptive Transfer in mit Pertussis Toxin vorbehandelte SJL-Mäuse konnte keine klinischen Symptome induzieren. Im zweiten Teil der Arbeit wurden die Untersuchungen daher auf Antikörper gegen weitere Myelinpeptide ausgedehnt. Hierbei konnte der Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein (MOG) 35-55 spezifische monoklonale IgM Antikörper 4E6-2 identifiziert werden, der Myelin in Paraffinschnitten spezifisch färbte. Zudem zeigte sich im Western Blot eine Bindung an MOG. Der Antikörper wurde in einem Transferversuch an Mäusen getestet, bei denen zuvor eine EAE durch adoptiven Transfer eines T_H1-Klons induziert worden war. Hierbei fand sich kein Hinweis auf eine krankheitsmodifizierende Wirkung des Antikörpers.

Zur weiteren Klärung der Rolle antikörpervermittelter Mechanismen im hier beschriebenen Modell ist eine *weitere Charakterisierung der Antikörper hinsichtlich ihrer Effektorfunktionen*, wie z.B. ihrer Fähigkeit zur Komplementaktivierung, erforderlich.

2 Summary

Multiple sclerosis (MS) is a chronic inflammatory demyelinating disease of the central nervous system. Clinical manifestation and progression of neurological deficits are highly heterogeneous and unpredictable. Clinical heterogeneity is reflected by four distinct histopathological patterns and defined patterns of cerebrospinal fluid pathology. T-cell mediated mechanisms seem to play a pivotal role in the course of disease. Furthermore humoral immunity seems to contribute essentially to inflammation in several subtypes of MS.

Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) is an animal model of MS. It can be either induced by active immunization with myelin components or by adoptive transfer of myelin specific CD4⁺ T_H1-cells. A shift towards a T_H2-response however has been considered to lead to an amelioration of the clinical course. Recent developments revealed that this T_H1-T_H2-paradigm is an oversimplification of the complex immune response during the course of EAE. Further T-cell subpopulations seem play a pivotal role in the pathogenesis of EAE. Adoptive Transfer of T_H17-cells e.g. is a very efficient way of EAE-induction without prior in-vitro stimulation.

In addition adoptive transfer of clonal proteolipidprotein (PLP) 139-151 specific T_H2-cells to immunocompetent non-transgenic SJL-mice in a new model leads to induction of an EAE with a chronifying course of disease. Demyelinating lesions in the chronic phase of disease contain B-cells, plasma cells, macrophages and massive deposits of antibodies. Furthermore PLP139-151 specific antibodies as well as antibodies against other myelin components can be detected in the serum of the animals. The aim of this study is the further characterization of the antibody response in this new T_H2-induced EAE model.

After EAE-induction by adoptive transfer of the prior established PLP139-151 specific T_H2 clone 3-3 spleen cells were obtained during the chronic phase of disease approximately 90 days after T-cell transfer. By fusion of these cells with cells of the Sp2 myeloma cell line antibody producing hybridoma cells were created. By cloning in limiting dilution technique followed by affinity chromatography of cell culture supernatants, monoclonal myelin specific antibodies were purified. For further characterization the so gained monoclonal antibodies were tested in myelin specific ELISAs and Western Blots, in immunohistochemistry on central nervous system (CNS) tissue samples and in adoptive transfer experiments.

A distinctive feature of this model is that monoclonal antibodies were generated without prior active immunization with myelin antigens. *This offers a completely new more physiologic approach to characterize T-cell-B-cell interactions and the role of antibodies in a new T_H2-induced EAE-Modell.*

In the first part of the study selected monoclonal PLP139-151 specific antibodies of isotype IgG1 and IgG2b were purified and characterized as described before. PLP139-151 specificity could be shown in a peptide coated ELISA. Neither in Western Blots nor in immunohistochemistry with CNS tissue samples could reactivity against PLP or other myelin components be observed. Adoptive transfer of antibodies in SJL-mice pre-treated with Pertussis toxin could not induce clinical symptoms of EAE. In the second part the study therefore was extended to monoclonal antibodies specific for other myelin components. The monoclonal myelin oligodendroglia glycoprotein (MOG) 35-55 specific antibody 4E6-2 stained MOG in a Western Blot as well as myelin on paraffin embedded CNS tissue sections. The antibody was tested in adoptive co-transfer experiments in SJL-mice after prior EAE-induction by adoptive transfer of cells of the myelin specific T_H1 clone cPLP 25. This experiment did not reveal a disease modifying effect of 4E6-2.

For clarification of the role of antibody mediated mechanisms in our new T_H2 mediated model of EAE in SJL-mice further characterization of these antibodies in regard to their effector functions like e.g. their ability to fix complement has to be carried out. Nevertheless the findings support the concept of pathogenetic heterogeneity of EAE and MS and might have an impact on the struggle for new therapeutic approaches.

3 Einleitung

3.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem der Vertebraten schützt den Organismus vor eindringenden Pathogenen und körpereigenen entarteten Zellen. Eine grundlegende Aufgabe hierbei besteht in der Unterscheidung zwischen intakten körpereigenen und pathologisch veränderten bzw. fremden Strukturen. Hierbei kommt zunächst die phylogenetisch ältere angeborene bzw. unspezifische Immunantwort zum Tragen, deren zelluläre Komponente von Monozyten, polymorphkernigen Granulozyten sowie natürlichen Killer (NK)-Zellen vermittelt wird.

Kann ein Erreger nicht sofort durch die angeborene Immunantwort eliminiert werden, setzt die erworbene Immunantwort ein, die sich durch Spezifität bzw. Ausbildung eines Gedächtnisses auszeichnet. Ihre hauptsächlichen Mediatoren sind B- und T-Lymphozyten. T-Lymphozyten tragen membranständige Rezeptoren auf ihrer Oberfläche, B-Lymphozyten produzieren zusätzlich eine lösliche Rezeptorvariante – die Antikörper. Die Strukturen, an die die Rezeptoren binden, werden als Antigene bezeichnet, der Teil eines Antigens, der mit dem Rezeptor interagiert, als Epitop. T-Zell- und B-Zell-Rezeptoren bestehen aus Glykoproteinketten mit einer konstanten und einer variablen Region, wobei die antigenbindende Funktion durch den variablen Teil ausgeübt wird. Theoretisch kann für jedes Antigen ein passender Rezeptor gebildet werden. Da dabei auch potentiell autoreaktive Zellen entstehen, erfolgen noch am Ort der Zellreifung im Thymus (T-Zellen) bzw. Knochenmark (B-Zellen) Depletionen von autoreaktiven Zellen (van Meerwijk, et al. 1997; Jameson, et al. 1998; Wardemann, et al. 2003). Die enorme Rezeptorvielfalt entsteht bei heranreifenden B- und T-Lymphozyten durch somatische Genrekombination: Die DNA-Sequenzen, die für die variablen Regionen der Antikörper und T-Zell-Rezeptoren kodieren, sind in der Keimbahn-DNA auf verschiedene Gensegmente verteilt. Für jedes Segment liegen multiple Kopien vor. Durch Rekombination auf DNA-Ebene werden in unterschiedlichen Zellen jeweils zufällig ausgewählte Kopien der einzelnen Segmente zusammengefügt (Davis, et al. 1988; Cook, et al. 1995). Wird das Immunsystem mit einem Pathogen konfrontiert, werden B- oder T-Zellen, welche das Antigen spezifisch erkennen, stimuliert und proliferieren. Dieser Prozess wird als klonale Selektion bezeichnet (Klinman 1996; Sprent, et al. 2002).

Bei der Interaktion der Rezeptoren mit ihren Liganden gibt es zwischen B- und T-Zellen wesentliche Unterschiede. B-Zell-Rezeptoren binden Konformationsepitope gelöster

Antigene, wobei deren dreidimensionale Struktur eine große Rolle spielt. T-Zell-Rezeptoren können nur zuvor intrazellulär prozessierte Antigene erkennen, die als kurze Peptide von spezialisierten Glykoproteinen auf der Oberfläche von Zellen präsentiert werden. Nach der Genregion, dem Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex, MHC), in der die für diese Proteine kodierenden Gene liegen, werden sie als MHC-Moleküle bezeichnet.

Man unterscheidet zwei Klassen von MHC-Molekülen, die mit unterschiedlichen Subpopulationen der T-Lymphozyten interagieren (Zinkernagel, et al. 1997). Der MHC ist einerseits polygen, d.h. mehrere MHC-Klasse-I und Klasse-II-Gene kodieren Peptide mit unterschiedlichen Peptidbindungsspezifitäten. Andererseits ist der MHC polymorph, d.h. es gibt für jedes Gen multiple Allele. Unter einem MHC-Haplotyp versteht man die Kombination von MHC-Allelen auf einem Chromosom. Beim Menschen liegt der MHC auf Chromosom 6 und wird als HLA (humanes Leukozyten Antigen) bezeichnet, bei Mäusen liegt er auf Chromosom 17 und wird mit H-2 bezeichnet. (Akerstrom, et al. 1985)

MHC-Moleküle der Klasse I (HLA-A, -B, -C beim Menschen und H2-K, -D, -L bei der Maus) werden auf fast allen zellkernhaltigen körpereigenen Zellen exprimiert und präsentieren Peptidbestandteile von körpereigenen Proteinen sowie von Pathogenen, die sich im Zytosol replizieren können (Viren, Protozoen, intrazelluläre Bakterien) und zuvor in Proteasomen degradiert wurden. Peptide, die an MHC-I-Moleküle binden, sind im Allgemeinen acht bis zehn Aminosäuren lang. Komplexe aus MHC-I-Molekülen und Peptiden interagieren mit den CD8 positiven (CD8+) T-Zellen (Garboczi, et al. 1996; Garcia, et al. 1996a). Aktivierte CD8+ T-Zellen können durch Perforinsekretion infizierte Zellen lysieren und werden daher auch zytotoxische T-Zellen genannt.

MHC-Moleküle der Klasse II (HLA-DR, -DP, -DQ beim Menschen und I-A, I-E bei der Maus) werden auf antigenpräsentierenden Zellen exprimiert, z.B. auf Makrophagen, dendritischen Zellen oder B-Zellen. Im humanen Immunsystem exprimieren aktivierte T-Zellen MHC-II-Moleküle, bei Mäusen jedoch nicht. MHC-II-Moleküle präsentieren Peptide, die aus degradierten Proteinen intrazellulärer Vesikel gewonnen wurden. Diese Proteine können von körpereigenen Proteinen oder von exogenen Pathogenen, wie z.B. Bakterien oder Parasiten stammen, die durch Phago- oder Pinozytose in die Zelle gelangen konnten. Die Peptide, die von MHC-II-Molekülen präsentiert werden, sind mindestens 13 Aminosäuren lang, können aber auch wesentlich länger sein. Analog zu den MHC-I-Molekülen agieren Komplexe aus Peptiden und MHC-II-Molekülen mit T-Zellen, die auf ihrer Oberfläche CD4 Moleküle tragen (CD4+ T-Zellen).

CD4 und CD8 Moleküle fungieren als Korezeptoren des T-Zell-Rezeptors (Garcia, et al. 1996b). Anhand ihres Zytokinprofils können CD4⁺ T-Zellen in T_H1 und T_H2-Zellen unterschieden werden: T_H1-Zellen produzieren u.a. Interferon- γ (IFN- γ), Tumornekrose-Faktor- α (TNF- α) und Interleukin-2 (IL-2) und aktivieren die zellvermittelte Immunität. T_H2-Zellen synthetisieren u.a. IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 und stimulieren die antikörpervermittelte humorale Immunantwort (Romagnani 1997).

Anhand der Oberflächenmarker CD5, Mac-1 und IgM können zwei unterschiedliche B-Zell-Populationen unterschieden werden. B1-Zellen exprimieren CD5, Mac-1 sowie IgM. Sie sind hauptsächlich in serösen Körperhöhlen zu finden, tragen niedrigaffine, polyreaktive Rezeptoren, die an repetitive bakterielle Polysaccharidantigene binden und sind thymusunabhängig (Fagarasan, et al. 2000). B2-Zellen sind hingegen thymusabhängig, d.h. sie erfordern eine T-Helfer-Zell-vermittelte Aktivierung. Diese erfolgt, wenn T-Zellen den Komplex aus Peptid und MHC-II auf der B-Zell-Oberfläche erkennen. Dies geschieht sowohl über oberflächengebundene Moleküle wie CD40L als auch lösliche Effektormoleküle wie IL-4. IL-4 und CD40L sind wesentlich an der klonalen Expansion von B-Zellen beteiligt. IL-5 und IL-6 sind hingegen für die Differenzierung einer B-Zelle zur Plasmazelle wesentlich (Garside, et al. 1998).

Die Funktion von B- bzw. T-Lymphozyten wird durch vielfältige Interaktionen bestimmt. B-Zellen können einerseits Pathogene im Extrazellularraum binden und auf diese Weise neutralisieren oder opsonisieren, d.h. der Aufnahme durch Phagozyten zugänglich machen. Darüber hinaus können sie das Antigen über ihre Rezeptoren aufnehmen, prozessieren und auf MHC-Molekülen der Klasse II CD4⁺ T-Zellen präsentieren. T_H2-Zellen können B-Zellen aktivieren, wenn sie den Komplex aus Peptid und MHC-II an der Oberfläche der B-Zellen erkennen. Dies geschieht einerseits durch zellgebundene Oberflächenmoleküle der T-Zellen wie CD40L und andererseits durch Zytokine, die von T_H2-Zellen sezerniert werden. Die Stimulation durch T-Zellen induziert in B-Zellen genetische Modifikationen – den Isotypklassenwechsel und die somatische Hypermutation.

Unter Isotypen versteht man unterschiedliche Klassen von Immunglobulinen, die sich in der konstanten Region ihrer schweren Ketten unterscheiden (IgM, IgG, IgD, IgA und IgE). Nach Stimulation durch ihr Antigen produzieren naive B-Zellen zunächst IgM. Im Zuge weiterer Differenzierung kann durch einen Klassenwechsel statt IgM z.B. IgG gleicher Spezifität produziert werden (Coffman, et al. 1993). Die einzelnen Isotypen unterscheiden sich in Bezug auf ihre funktionellen Eigenschaften, wie z.B. Serumhalbwertszeit, Komplementaktivierung und die Bindungsaffinität zu Rezeptoren

für den konstanten Kettenanteil (Fc-Rezeptoren), die sich z.B. auf Makrophagen befinden. Der Isotypklassenwechsel wird durch Interaktion mit T-Zellen reguliert. So kann z.B. IL-10 den Wechsel von IgD zu IgG1 oder IgG3, IL-4 den Wechsel von IgM zu IgE induzieren (Pene, et al. 1988; Briere, et al. 1994).

Nach Aktivierung von B-Zellen durch ihr Antigen kommt es bei sich rasch teilenden B-Zellen in den Keimzentren peripherer lymphatischer Organe zur somatischen Hypermutation. Hierbei werden in den umgeordneten für die variablen Regionen kodierenden Genabschnitten in großem Umfang Punktmutationen induziert. B-Zellen, die im Folgenden das Antigen noch besser erkennen, werden selektiert und können zu antikörperproduzierenden Plasmazellen ausreifen (Allen, et al. 1987; Neuberger, et al. 1995). Dieser Prozess wird als Affinitätsreifung der B-Zellen bezeichnet. Bei T-Lymphozyten findet hingegen keine Affinitätsreifung statt.

3.2 Multiple Sklerose

3.2.1 Verlaufsformen und Therapie

Die Multiple Sklerose ist in Europa und Nordamerika mit einer Prävalenz von 60 – 200 pro 100.000 Einwohner bzw. einer jährlichen Inzidenz von ca. 3,5 bis 5 pro 100.000 Einwohner die häufigste demyelinisierende Erkrankung des zentralen Nervensystems (Sadovnick, et al. 1993b). Die Erkrankung ist durch Inflammation, Demyelinisierung und neurodegenerative Prozesse gekennzeichnet. Sie ist nach heutigen Vorstellungen eine Erkrankung, bei der T-Zell-vermittelte Mechanismen eine wesentliche Rolle spielen und die sich bei genetisch prädisponierten Personen in Abhängigkeit von Umwelteinflüssen entwickeln kann. Welche Faktoren im Einzelnen zum Ausbruch der Erkrankung führen, ist derzeit noch unklar (Sospedra, et al. 2005).

Als Anfangsstadium der Erkrankung wird das klinisch-isolierte Syndrom beschrieben. Hierunter versteht man das erstmalige Auftreten einer klinischen Symptomatik, die auf ein demyelinisierendes Ereignis hindeutet, die Kriterien einer zeitlichen Dissemination jedoch nicht erfüllt. In 85-90% der Fälle verläuft die Erkrankung zunächst schubförmig, wobei sich die Symptome im Verlauf vollständig oder partiell zurückbilden. Unter einem Krankheitsschub versteht man jede neu aufgetretene, länger als 24 Stunden anhaltende Symptomatik, die nicht mit einer Änderung der Körpertemperatur oder Infektionen in Zusammenhang gebracht werden kann und mit einem zeitlichen Abstand von mindestens 30 Tagen zu vorangegangenen Schüben auftritt (Poser, et al. 1983; McDonald, et al. 2001). Die schubförmig verlaufende MS (relapsing-remitting MS (RR-

MS)) betrifft Frauen doppelt so häufig wie Männer und manifestiert sich meist in einem Alter zwischen 20 und 40 Jahren. Sie geht bei ungefähr 70% der Patienten innerhalb von 10 Jahren in eine sekundär progrediente Verlaufsform (SP-MS) über. Bei etwa 10 – 15 % der Patienten verläuft die Erkrankung primär progredient (PP-MS). Diese Verlaufsform betrifft v.a. Patienten, bei denen sich die Erkrankung erstmals nach dem 40. Lebensjahr manifestiert und betrifft beide Geschlechter gleichermaßen. Die schubförmig verlaufende MS beginnt häufig mit Sehstörungen, Störungen der Sensibilität oder motorischen Ausfällen. Im weiteren Verlauf treten Spastiken, Störungen der Koordination, Blasenstörungen sowie neuropsychologische Defizite in den Vordergrund (McFarlin, et al. 1982a; McFarlin, et al. 1982b; Noseworthy, et al. 2000).

Zur Sicherung der Diagnose einer schubförmig verlaufenden MS ist der objektive Nachweis räumlich und zeitlich disseminierter Läsionen im zentralen Nervensystem erforderlich. Neben dem klinischen Befund kommt dem Nachweis charakteristischer Läsionen im Bereich der weißen Substanz des ZNS mittels Magnetresonanztomographie eine zentrale Rolle zu (McDonald, et al. 2001). Der Liquor der betroffenen Patienten zeigt in der Regel charakteristische entzündliche Veränderungen: Neben einer moderaten mononukleären Pleozytose mit bis zu 50 Zellen pro μl kann bei ca. 95% der Patienten eine intrathekale Synthese von Immunglobulinen nachgewiesen werden. Bislang konnten die Zielantigene dieser Immunantwort bei der multiplen Sklerose nicht identifiziert werden.

Die Lebenserwartung der Patienten ist in der Regel nicht verkürzt. Bei etwa einem Drittel der Erkrankten entwickeln sich keine, bei einem Drittel nur geringe funktionelle Einschränkungen (z.B. Minderung der Gehstrecke). Ein weiteres Drittel erleidet einen sehr ungünstigen Verlauf mit einer deutlichen Behinderung bis hin zu Rollstuhlpflichtigkeit und Bettlägerigkeit. Sehr schwere Verläufe, die innerhalb von Monaten bis wenigen Jahren zum Tod führen, sind selten (< 5%). Diese Heterogenität des klinischen Verlaufs ist charakteristisch für die MS.

Akute Schübe der schubförmig verlaufenden MS werden mit hochdosierten Glukokortikosteroiden behandelt (Kaufman, et al. 2000). Bei einem klinisch schwergradigen Schub kann bei fehlendem Ansprechen zudem eine Plasmapherese erwogen werden (Keegan, et al. 2002). Bislang stehen verlaufsmodifizierende Therapien lediglich für die schubförmigen Verlaufsformen zur Verfügung. Therapieziele sind die Verminderung der Schubfrequenz sowie eine Verlangsamung der Krankheitsprogression durch Reduktion der entzündlichen und demyelinisierenden

Krankheitsaktivität. Das Ansprechen einzelner Patienten auf die Therapie lässt sich aufgrund der Heterogenität der Multiplen Sklerose in Pathogenese und Verlauf nicht prognostizieren (Noseworthy, et al. 2000). Derzeit werden zur Schubprophylaxe als Basistherapie die β -Interferone 1a (Avonex®, Rebif®) und 1b (Betaferon®) sowie Glatirameracetat (GA) (Copaxone®) eingesetzt, deren immunmodulatorische Funktionen noch nicht vollständig geklärt sind.

Die Wirkung von INF- β wird u.a. durch Suppression der Proliferation peripherer T-Zellen, Verminderung der Matrix-Metalloproteinasen- sowie adhäsionsmolekülvermittelten T-Zell-Migration, Verminderung der INF- γ - induzierten Hochregulation von MHC-II-Molekülen sowie der Induktion eines T_H2 Zytokinshifts vermittelt (Weinstock-Guttman, et al. 1995; Pette, et al. 1997; Rep, et al. 1999). Glatirameracetat ist ein synthetisches Polypeptid mit einer Länge von 45 bis 100 Aminosäuren, bestehend aus einer randomisierten Mischung der L-Aminosäuren Glutamat, Alanin, Lysin und Thyrosin. Die Wirkung von GA beruht u.a. auf der haplotypunabhängigen Bindung an MHC Klasse II Moleküle antigenpräsentierender Zellen. Als altered peptide ligand könnte GA somit die Aktivierung anti-inflammatorischer GA-reaktiver T-Zellen induzieren (Arnon 1996; Fridkis-Hareli, et al. 1998; Neuhaus, et al. 2001).

Bei anhaltender oder zunehmender Krankheitsaktivität unter der begonnenen Basistherapie sollte entweder eine Umstellung der Therapie auf ein anderes Wirkprinzip (z.B. von Interferon- β auf GA oder umgekehrt) oder eine Therapieeskalation erfolgen. Hierfür stehen sowohl Natalizumab (Tysabri®) als auch Fingolimod (Gilenya®) zur Verfügung.

Natalizumab fungiert als selektiver Adhäsionsmolekülinhibitor. Die Zielstruktur des humanisierten monoklonalen Antikörpers ist die α_4 -Integrin-Kette, durch deren Blockade die transendotheliale Migration mononukleärer Zellen in entzündlich veränderte Gewebe gehemmt wird (Tubridy, et al. 1999; Ransohoff 2007). Aufgrund des erhöhten Risikos für das Auftreten einer progressiven multifokalen Leukenzephalopathie im Rahmen der Therapie sollte eine individuelle Risikoabwägung unter Einbeziehung der Immunkompetenz des Patienten bzw. der Vortherapie erfolgen (Gold, et al. 2007). Fingolimod ist eine oral verfügbare Substanz zur krankheitsmodifizierenden Monotherapie der hochaktiven schubförmig verlaufenden MS. Als strukturelles Analogon von Sphingosin wirkt Fingolimod über eine Interaktion mit Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoren, welche sich auf Lymphozyten befinden. Hierdurch kommt es zu einer Inhibition der Lymphozytenmigration aus sekundären lymphatischen Geweben. Dies führt zu einer Reduktion von CD4+ T-Zellen sowie B-

Zellen im peripheren Blut und somit zu einer Immunmodulation (Matloubian, et al. 2004; Brinkmann, et al. 2010; Warnke, et al. 2011).

Für die weitere Eskalationstherapie bei anhaltender Krankheitsaktivität der schubförmig verlaufenden MS bzw. der sekundär progredienten MS ist darüber hinaus das Zytostatikum Mitoxantron (Novantron®) aus der Gruppe der Anthrazykline zugelassen, dessen Wirkung im Wesentlichen durch Hemmung der Topoisomerase II, DNA-Interkalation und Induktion von DNA-Strangbrüchen vermittelt wird. Die immunsuppressive Wirkung von Mitoxantron wird durch Hemmung der Proliferation von Makrophagen sowie B- und T-Lymphozyten, Induktion von Apoptose v.a. bei B-Lymphozyten und Zell-Lyse v.a. von B-Lymphozyten bedingt (Fidler, et al. 1986a; Fidler, et al. 1986b; Neuhaus, et al. 2005).

3.2.2 Ätiologie und Pathogenese

3.2.2.1 Genetik und Umwelteinflüsse

Sowohl genetische Faktoren als auch Umweltfaktoren scheinen Suszeptibilität und Verlauf der Multiplen Sklerose zu beeinflussen. Das absolute Risiko als Verwandter ersten Grades ebenfalls an einer MS zu erkranken, liegt bei 2 bis 5 Prozent und ist somit 20 bis 50 Mal höher als das der Durchschnittsbevölkerung. Das Risiko für Ehepartner oder adoptierte Kinder ist hingegen nicht erhöht. Die Konkordanzrate bei monozygoten Zwillingen liegt bei etwa 25%, was den Einfluss nichtvererbbarer Faktoren auf die Manifestation der Erkrankung unterstreicht (Sadovnick, et al. 1993a; Sadovnick, et al. 1993b; Compston, et al. 2002; Dyment, et al. 2004). Ähnlich anderer T-Zell-vermittelter Autoimmunerkrankungen wird den HLA-DR und –DQ Genen eine besondere Rolle bei der Manifestation einer MS zugeschrieben. Der HLA-DR15 Haplotyp ist in der kaukasischen Bevölkerung mit einer erhöhten Suszeptibilität für eine MS verbunden (Hillert, et al. 1993; Sommer, et al. 1996; Schmidt, et al. 2007; Sawcer, et al. 2011).

Die Prävalenz der Multiplen Sklerose variiert weltweit zwischen 60 – 200 pro 100.000 Einwohner in Teilen Nordamerikas, Nordeuropas und Südaustraliens bis hin zu 6 – 20 pro 100.000 in Niedrigrisikogebieten wie z.B. Japan. In fast allen Zonen mit hoher oder mittlerer Prävalenz findet sich eine überwiegend kaukasische Bevölkerung. Auffällig ist hierbei eine vom genetischen Hintergrund der Bevölkerung unabhängige Abnahme der Erkrankungshäufigkeit von den gemäßigten Klimazonen hin in Richtung des Äquators. In Migrationsstudien konnte gezeigt werden, dass sich das Risiko für Migranten aus Niedrig-Risikogebieten nur bis zum Alter von 15 Jahren an jenes von Hoch-

Risikogebieten angleicht bzw. umgekehrt (Kurtzke 1991; Sadovnick, et al. 1993b). Unter den Umweltfaktoren, die auf den Krankheitsverlauf Einfluss nehmen könnten, wird viralen Infektionen eine besondere Bedeutung zugeschrieben, da diese häufig mit Erkrankungsschüben assoziiert sind (Buljevac, et al. 2002). Mögliche Trigger-Kandidaten sind u.a. die neurotrophen Herpesviren Humanes Herpes Virus 1 und 6, Varizella-Zoster-Virus sowie Epstein-Barr-Virus (Soldan, et al. 2000; Wandinger, et al. 2000; Gronen, et al. 2006; Ruprecht, et al. 2006).

3.2.2.2 Pathogenetische Heterogenität

Aufgrund der Heterogenität des klinischen Verlaufs der Erkrankung sind weder individuelle Voraussagen bezüglich der Progression der neurologischen Defizite noch bezüglich des therapeutischen Ansprechens möglich (Noseworthy, et al. 2000; Compston, et al. 2002). Hinweise auf die pathogenetische Heterogenität der Multiplen Sklerose ergeben sich neben den klinischen Befunden vor allem aus histopathologischen Untersuchungen. Die Entmarkungsherde (Plaques) sind in variabler Größe über das zentrale Nervensystem verteilt und finden sich v.a. im Bereich des Sehnerven, der periventrikulären weißen Substanz, des Hirnstamms, des Kleinhirns sowie der Hinterstränge des Rückenmarks.

Morphologisch sind die Plaques durch entzündliche Zellinfiltrate, Demyelinisierung mit Verlust myelinbildender Oligodendrozyten, axonale Schädigung sowie Bildung eines astrozytischen glialen Narbengewebes gekennzeichnet (Lassmann 1998). Axonale Schäden manifestieren sich bereits in der Frühphase eines Krankheitsschubes, schreiten auch nach Abklingen der Entzündung auf einem niedrigen Niveau weiter fort und sind für persistierende neurologische Defizite mitverantwortlich (Kuhlmann, et al. 2002; Medana, et al. 2003). Neben der Demyelinisierung kann es in unterschiedlichem Maße auch zu einer Remyelinisierung im Bereich der Plaques kommen, wobei das Ausmaß mit dem Vorhandensein von Oligodendrozyten korreliert. Die Rückbildung der Symptome wird mit der Auflösung inflammatorischer Ödeme und partieller Remyelinisierung in Zusammenhang gebracht. Irreversible axonale Schädigung, gliotische Vernarbung und Oligodendrozytenverlust führen zu voranschreitenden neurologischen Defiziten (Lassmann, et al. 1997; Noseworthy, et al. 2000).

MS-Läsionen können in vier histopathologische Muster unterschieden werden. Unterschiedliche aktive Läsionen eines Patienten zeigen hierbei eine homogene Morphologie, sind im Zeitverlauf stabil und können teilweise auch mit bestimmten klinischen Verlaufsformen korreliert werden (Lassmann 1998; Lucchinetti, et al. 1999; Lucchinetti, et al. 2000) (Tab. 1).

Typ I	<ul style="list-style-type: none"> • T-Lymphozyten und Makrophagen sind das dominierende Infiltrat. • Es kommt zu einer Demyelinisierung mit geringem Oligodendrozytenverlust.
Typ II	<ul style="list-style-type: none"> • Neben T-Lymphozyten und Makrophagen sind Ablagerungen von Antikörpern sowie eine Komplementaktivierung nachweisbar • Es kommt zur Zerstörung reifer Oligodendrozyten mit nachfolgender Remyelinisierung
Typ III	<ul style="list-style-type: none"> • Führende Charakteristika sind Demyelinisierung und Oligodendrozytendystrophie.
Typ IV	<ul style="list-style-type: none"> • Es kommt zu einem primären Oligodendrozytentod mit sekundärer Entmarkung. • Dieses Muster zeigte sich nur bei einer Gruppe von Patienten mit PP-MS.

Tabelle 1: Histopathologische Muster der Multiplen Sklerose (Lucchinetti, et al. 2000)

Die klinische Heterogenität spiegelt sich darüber hinaus im Liquorzytologiemuster wieder. Bei Patienten mit einer Multiplen Sklerose finden sich im Rahmen einer durchflusszytometrischen Studie unterschiedliche dominierende Zellpopulationen, die über den Untersuchungszeitraum hinweg stabil waren. Es können je nach dominierender Zellpopulation drei Phänotypen unterschieden werden: ein überwiegend Monozyten dominierter Phänotyp, ein überwiegend von B- und Plasmazellen dominierter Phänotyp sowie einen Mischtyp aus Monozyten und B-Zellen. Eine Korrelation mit klinischen Daten zeigt, dass der Monozytentyp mit geringerer Krankheitsaktivität und leichter Progression der B-Zell-Typ dagegen mit einer raschen Progression korreliert (Cepok, et al. 2001). Der klinisch heterogene Verlauf der Multiplen Sklerose scheint mit unterschiedlichen Effektormechanismen einherzugehen, die individuell im zeitlichen Verlauf stabil sind und einen Einfluss auf die Prognose haben. Ein verbessertes Verständnis könnte zur Entwicklung zielgerichteterer Therapieansätze beitragen. In Studien konnte z.B. gezeigt werden, dass insbesondere bei Patienten mit dem histopathologischen Typ II, der mit Antikörperablagerungen und Komplementaktivierung einhergeht, der klinische Verlauf in der akuten Schubsituation durch eine Plasmapherese günstig beeinflusst werden kann (Keegan, et al. 2005).

3.2.2.3 Immunologische Konzepte

Die Multiple Sklerose wird als eine im Wesentlichen durch CD4+ T-Zellen vermittelte Autoimmunerkrankung verstanden. Diese Sicht stützt sich zum einen auf die histopathologische Analyse entzündlicher demyelinisierender Läsionen sowie zum anderen auf die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) – einem Tiermodell der Multiplen Sklerose (Sospedra, et al. 2005). Bei der EAE kommt es nach Injektion von Myelinkomponenten mit geeigneten Adjuvantien in susceptible Tiere zu einer durch CD4+ T-Zellen vermittelten demyelinisierenden Erkrankung, die Ähnlichkeiten mit der Multiplen Sklerose aufweist. Die Erkrankung ist klinisch durch das Auftreten von Lähmungen sowie histologisch durch perivaskuläre, mononukleäre Infiltrate im ZNS charakterisiert (Rivers, et al. 1933; Martin, et al. 1995). Zudem kann die EAE durch den adoptiven Transfer ZNS-Antigen spezifischer CD4+ T-Zellen in naive Tiere ausgelöst werden (Pettinelli, et al. 1981; Ben-Nun, et al. 1982; Zamvil, et al. 1985). Nur in einzelnen Studien konnte eine EAE hingegen durch den alleinigen Transfer CD8+ T-Zellen transferiert werden (Huseby, et al. 2001; Sun, et al. 2001).

Seit der Beschreibung von oligoklonalen Banden im Liquor von an MS erkrankten Patienten als Zeichen der intrathekalen Immunglobulinsynthese wird darüber hinaus jedoch auch die Rolle Antikörper vermittelter Mechanismen bei der Pathogenese der Multiplen Sklerose diskutiert (Kabat, et al. 1942; Cross, et al. 2001). B-Zellen, Plasmazellen und myelinspezifische Antikörper finden sich sowohl in Gebieten aktiven Myelinabbaus als auch als Bestandteil chronischer Plaques (Gerritse, et al. 1994; Storch, et al. 1998; Genain, et al. 1999). Der häufigste Läsionstyp bei den Untersuchungen von Lucchinetti et al. war mit über 50% der mit Antikörper- und Komplementablagerungen einhergehende Typ II (Lucchinetti, et al. 2000). Auch in sehr frühen MS-Läsionen konnten Immunglobulinkomplexe und Komplement nachgewiesen werden, so dass von einer Beteiligung Antikörper vermittelter Mechanismen bereits in der initialen Phase der Läsionsentstehung ausgegangen werden kann (Gay, et al. 1997). Sowohl in Liquor als auch im Gehirn von an MS erkrankten Patienten können klonale T-Zell vermittelte B-Zell-Expansionen nachgewiesen werden (Owens, et al. 1998; Qin, et al. 1998; Baranzini, et al. 1999), bei denen es durch somatische Hypermutationen zu einer Affinitätsreifung kommt (Qin, et al. 1998). Entsprechende Veränderungen lassen sich im Liquor von Patienten mit einem klinisch isolierten Syndrom nachweisen und deuten auf B-Zell vermittelte Effektormechanismen in einer frühen Phase der Multiplen Sklerose hin (Qin, et al. 2003).

3.3 Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis

3.3.1 Limitationen des T_H1-T_H2-Paradigmas

Die EAE ist eines der am besten charakterisierten Tiermodelle für Autoimmunreaktionen. Seit der erstmaligen Beschreibung durch Charles Rivers (Rivers, et al. 1933) wurde eine Vielzahl von EAE-Modellen v.a. vor dem Hintergrund von unterschiedlichen Nagetierzuchtstämmen etabliert. Häufig verwendete Tiere sind die SJL-Maus sowie die Lewis-Ratte, bei denen sich die EAE hinsichtlich des klinischen Verlaufs und der histopathologischen Läsionen wesentlich unterscheidet. Die EAE der SJL-Maus zeigt einen schubförmigen Verlauf, wohingegen die EAE der Lewis-Ratte monophasisch ist. Neben zellulären Infiltraten zeigen sich bei der SJL-Maus für Lewis-Ratten untypische Demyelinisierungen (Martin, et al. 1995). Bei beiden Stämmen spielen CD4⁺ T-Zellen eine wesentliche Rolle in der Pathogenese. T-Zellen der Lewis-Ratte erkennen Myelinpeptide überwiegend mit T-Zellrezeptoren der V β 8-Familie (Offner, et al. 1993), die bei SJL-Mäusen deletiert ist. Myelinspezifische T-Zellen sind bei SJL-Mäusen in ihrem T-Zell-Rezeptor-Repertoire hingegen heterogen – die Antigenerkennung ist mit unterschiedlichen V β -Ketten möglich (Su, et al. 1992).

Die am besten charakterisierten Myelinantigene zur Induktion einer EAE sind das Myelin Basische Protein (MBP) (Sakai, et al. 1988), das Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein (MOG) (Amor, et al. 1993) sowie das Proteolipidprotein (PLP) (Tuohy, et al. 1988). Hinsichtlich der Suszeptibilität der unterschiedlichen Inzuchtstämme ist der jeweilige MHC-Haplotyp der wichtigste determinierende Faktor (Martin, et al. 1995). Aufgrund einer Deletion im für die H2-E α -Kette kodierenden Gen ist I-A^s das einzige bei SJL-Mäusen funktionell exprimierte MCH-Klasse II Molekül (Kalbus, et al. 2001), was zu einer entsprechenden Restriktion führt. Die Induktion einer EAE kann sowohl mit einem Homogenat aus Rückenmarksgewebe als auch mit einzelnen Myelinpeptiden mit komplettem Freund-Adjuvans (CFA) erfolgen. Je nach MHC-Haplotyp sind unterschiedliche Epitope der Myelinproteine bzw. die entsprechenden Peptide enzephalitogen, d.h. können bei Applikation eine EAE auslösen. Die MBP-Epitope 68-88 und 87-99 sind beispielsweise in der Lewis-Ratte immundominant, wohingegen das MBP-Epitop 89-101 in der SJL-Maus (I-A^s) bzw. MBP1-9 in der PL/J Maus (I-A^u) immundominant sind (Martin, et al. 1995). Tabelle 2 bietet einen Überblick zu häufig verwendeten EAE-Modellen. Die Heterogenität der EAE-Modelle ist eine Folge der immunologischen Unterschiede zwischen den einzelnen Spezies bzw.

Inzuchtstämmen. Ursächlich sind insbesondere Unterschiede der einzelnen MHC-Systeme (Kumanovics, et al. 2003).

Stamm	MHC Haplotyp	Antigen	Klinischer Verlauf	Referenz
Maus				
SJL/J	H-2 ^s	Rückenmarkshomogenat	akut-monophasisch	(Bernard, et al. 1975)
		MBP 89-101	akut-monophasisch	(Sakai, et al. 1988)
		PLP 139-151 PLP 178-191	relapsierend-remittierend	(Tuohy, et al. 1989; Greer, et al. 1992)
		MOG 92-106	relapsierend-remittierend	(Amor, et al. 1993)
C57BL/6	H-2 ^b	MOG 35-55	Chronisch	(Mendel, et al. 1995; Petersen, et al. 2004)
PL/J	H-2 ^u	Rückenmarkshomogenat	akut-monophasisch	(Fritz, et al. 1983b; Fritz, et al. 1983a)
		MBP 1-9, MBP 35-47	chronisch-remittierend	(Zamvil, et al. 1986; Zamvil, et al. 1988)
		MOG 35-55	relapsierend-remittierend	(Kerlero de Rosbo, et al. 1995)
		PLP 43-64	chronisch-remittierend	(Whitham, et al. 1991)
B10.PL	H-2 ^u	Rückenmarkshomogenat	akut-monophasisch	(Fritz, et al. 1985)
		MBP 1-37	chronisch-remittierend	
Ratte				
Lewis	I	Rückenmarkshomogenat	akut-monophasisch	(Vandenbark, et al. 1974)
		MBP 68-88	akut-monophasisch	(Westall, et al. 1977; Chou, et al. 1979)
		MBP 72-84 (I-A) MBP 87-99 (I-E)		
		MOG 35-55	relapsierend-remittierend	(Linnington, et al. 1993)

Tabelle 2: Häufig verwendete EAE-Nagetiermodelle (modifiziert nach (Nessler 2005))

Das Proteolipid Protein (PLP) ist ein aus 276 Aminosäuren bestehendes Protein, welches bei SJL-Mäusen die dominante enzephalitogene Komponente des Myelins zu sein scheint. Die wichtigsten enzephalitogenen Epitope des PLP für die SJL-Maus sind PLP 139-151 sowie PLP 178-191 (Kuchroo, et al. 2002). Bereits im T-Zell Repertoire naiver SJL-Mäuse lässt sich eine Expansion PLP139-151 spezifischer T-Zellen nachweisen (Anderson, et al. 2000).

Die EAE galt lange als eine im wesentlichen T_H1-vermittelte Erkrankung, die durch den adoptiven Transfer aktivierter CD4⁺ T_H1-Zellen in naiven Tieren induziert werden kann (Zamvil, et al. 1990). Eine nähere Charakterisierung enzephalitogener T-Zell-Linien bzw. Klone zeigt, dass diese in der Regel ein T_H1- typisches Zytokinprofil bestehend aus IFN- γ , IL-2 sowie TNF- α aufweisen sowie das Oberflächenmolekül VLA-4 exprimieren (Kuchroo, et al. 1993; Kalman, et al. 1995). Für eine T_H1-Differenzierung

ist das Vorhandensein der Zytokine INF- γ und IL-12 erforderlich. Eine Regulation erfolgt hierbei durch die Transkriptionsfaktoren T-bet, STAT1 und STAT4 (Szabo, et al. 2000).

Im Gegensatz hierzu wird CD4⁺ T-Zellen mit einem T_H2 Zytokinprofil (IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13) eine protektive Rolle im Verlauf der EAE zugeschrieben (Cash, et al. 1994; Rocken, et al. 1996; Steinman 1996). Die T_H2-Differenzierung ist IL-4 abhängig und wird durch STAT6, GATA3 und c-Maf vermittelt (Kim, et al. 1999; Yamashita, et al. 2004). Die Gabe von IL-4 führt zu einer Abschwächung der klinischen Symptome, zur Reduktion der demyelinisierenden Veränderungen sowie zur Hemmung proinflammatorischer Zytokine wie IL-2 und TNF- α (Racke, et al. 1994).

Weitere Studien konnten allerdings zeigen, dass das T_H1-T_H2-Paradigma eine zu starke Vereinfachung der Immunantwort im Rahmen der EAE Induktion darstellt. Bei üblicherweise EAE-resistenten BALB/c Mäusen kann nach IFN- γ knock-out durch MBP eine EAE mit fulminantem letalem Verlauf induziert werden (Krakowski, et al. 1996; Tran, et al. 2000). Andererseits hat ein IL-4 knock-out keinen Einfluss auf den Krankheitsverlauf (Bettelli, et al. 1998). In einem EAE-Modell in Weißbüschelaffen (*Callithrix jacchus*) konnte durch Tolerisierung gegen MOG zunächst eine protektive Immunantwort induziert werden, wobei es zu einem Zytokinshift von T_H1 nach T_H2 kam. Im weiteren Verlauf traten jedoch massive Autoantikörpertiter gegen MOG auf. Es kam zu einer letalen demyelinisierenden Erkrankung (Genain, et al. 1996). Zudem konnte sowohl in RAG 1 knock-out Mäusen als auch $\alpha\beta$ -T-Zell-Rezeptor defizienten Mäusen durch Transfer von MBP spezifischen CD4⁺ T_H2-Zellen eine EAE induziert werden (Lafaille, et al. 1997). Es zeigt sich, dass T_H2-Zellen durchaus eine akute EAE induzieren können, wobei dies allerdings bislang nur bei immundefizienten Tieren möglich war.

Arbeiten der letzten Jahre haben die zentrale Bedeutung weiterer T-Zell-Subpopulationen bei der Pathogenese der EAE in den Vordergrund rücken lassen: T_H17-Zellen produzieren IL-17 unter Kontrolle von IL-23. Eine T_H17-Differenzierung wird durch IL-6 und TGF- β induziert und durch die Transkriptionsfaktoren ROR γ t und ROR α vermittelt (Yang, et al. 2008). Durch den adoptiven Transfer von T_H17-Zellen gelingt in vielen Modellen eine sehr effiziente EAE-Induktion auch ohne vorherige Stimulierung, z.B. durch Anti-CD3 oder Anti-CD28 Antikörper (Jager, et al. 2009). IL-17 defiziente Mäuse weisen einen deutlich mildereren Erkrankungsverlauf auf (Komiyama, et al. 2006). Im Gegensatz hierzu stehen Beobachtungen bei anderen EAE-Modellen, bei denen ein T_H17-Transfer keine EAE induzieren konnte (O'Connor, et al. 2008).

Als weitere CD4⁺ T-Zell-Subpopulation werden die regulatorischen T-Zellen, die durch die Expression von CD25 und FoxP3 charakterisiert sind, beschrieben. Ihnen wird eine wesentliche Rolle bei der Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz zugeschrieben (von Boehmer 2005; Kim, et al. 2007).

3.3.2 Rolle der humoralen Immunantwort bei der EAE

Die Rolle der humoralen Immunantwort bzw. die Interaktion zwischen humoralen und T-Zell-vermittelten Mechanismen tritt zunehmend in den Fokus der Betrachtungen. Im Gegensatz zu Tiermodellen der Myasthenia gravis konnte eine EAE bislang nicht durch den alleinigen adoptiven Transfer von Antikörpern induziert werden (Tzartos, et al. 1987; Cross, et al. 2001; Batoulis, et al. 2010). Ähnlich wie in MS-Läsionen gelingt auch bei EAE-Läsionen der Nachweis von Antikörperablagerungen: In einem MOG-induzierten EAE Modell bei *Callithrix jacchus* konnten mit Hilfe einer Immunogoldfärbung Ablagerungen MOG-spezifischer Antikörper nachgewiesen werden (Raine, et al. 1999).

Untersuchungen in B-Zell defizienten B10.PL Mäusen (I-A^u) zeigen, dass eine EAE auch in Abwesenheit von B-Zellen bzw. Antikörpern induziert werden kann. Hierbei lassen sich hinsichtlich des Krankheitsverlaufs bzw. der Schwere des klinischen Verlaufs keine Unterschiede zu Wildtypkontrollen beobachten (Wolf, et al. 1996). In einem anderen Modell in C57BL/6-Mäusen (H-2^b) hingegen ergibt ein Vergleich zwischen B-Zell defizienten Tieren bzw. Wildtypkontrollen, dass eine EAE-Induktion mit einem rekombinanten MOG-Protein nur in der Wildtypgruppe möglich ist. Durch Applikation des enzephalitogenen MOG-Peptides 35-55 kann jedoch in beiden Gruppen eine EAE induziert werden (Lyons, et al. 1999). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass je nach Art des induzierenden Antigens (Protein versus Peptid) B-Zell-vermittelte Effektormechanismen von unterschiedlicher Bedeutung sind.

In einem durch MBP-spezifische T-Zellen induzierten EAE-Modell der Lewis Ratte kommt es durch adoptiven Transfer MOG-spezifischer Antikörper zu einer verstärkten Demyelinisierung bzw. klinischen Aggravierung (Lassmann, et al. 1988; Linington, et al. 1988). Ähnliche Beobachtungen konnten bei einem adoptiven Transfermodell in SJL-Mäusen (H-2^s) gemacht werden (Schluesener, et al. 1987). Komplementvermittelte Effektormechanismen scheinen hierbei sowohl in vitro (Kerlero de Rosbo, et al. 1990) als auch in vivo eine wichtige Rolle zu spielen (Piddlesden, et al. 1993). Darüber hinaus wird bereits durch Antikörperbindung an MOG bzw. durch ein Crosslinking myelengebundener Antikörper eine Phosphorylierung von spezifischen

Proteinen induziert, die mit einer zellulären Stressantwort bzw. der Stabilität des Zytoskeletts in Zusammenhang gebracht werden (Marta, et al. 2005a; Marta, et al. 2005b).

In einem transgenen Mausmodell mit hohen MOG-spezifischen Antikörpertitern bereits in naiven Mäusen kommt es zu einer beschleunigten EAE-Induktion bzw. einer Aggravierung des klinischen Verlaufs (Litzenburger, et al. 1998). In einer Studie mit SJL-Mäusen wurden Tiere mit einem rekombinanten PLP-Protein-kodierenden Vakzinia Virus behandelt. Erst durch anschließende Immunisierung mit PLP-Peptiden (139-151, 178-191 sowie 104-117) konnte eine EAE induziert werden. Hierbei wurden erhöhte Anti-PLP-Titer sowie ein Isotypshift von IgG1 zu IgG2a und IgG2b beobachtet. Erhöhte Antikörpertiter gingen mit klinischer Exazerbation sowie verstärkter Demyelinisierung einher. Die Mehrheit der Antikörper war gegen PLP139-151 bzw. PLP178-191 und somit gegen typische T-Zell-Epitope gerichtet (Wang, et al. 1997).

Auf welche Art und Weise, in welchem Kompartiment und in welchem Umfang eine T-Zell-B-Zell-Interaktion im Rahmen der EAE stattfindet, bleibt letztlich unklar. In einigen Modellen ist die Induktion einer EAE zwar unabhängig von einer humoralen Immunantwort. Andererseits gehen erhöhte Antikörpertiter in anderen Modellen mit einer klinischen Exazerbation bzw. einer verstärkten Demyelinisierung einher. Es finden sich neben Antikörpern gegen MOG, welches an der Myelinoberfläche direkt zugänglich ist, auch Antikörper gegen PLP, welches sich v.a. im Inneren der Myelinlamellen findet. Eine aktive Immunisierung gegen Peptide, die typischerweise MHC-II-restringiert von T-Zellen erkannt werden, gelingt auch ohne B-Zell-Vermittlung. Andererseits bedarf die aktive Immunisierung mit Gesamtproteinen in einigen Modellen sehr wohl der Anwesenheit von B-Zellen, die hier als antigenpräsentierende Zellen agieren (Constant, et al. 1995a; Constant, et al. 1995b). Bei schubförmigen EAE-Modellen z.B. in SJL-Mäusen finden sich ektope Lymphfollikel bzw. B-Zell-Infiltrate im Bereich der Meningen und deuten auf eine ektope B-Zellreifung innerhalb des ZNS hin, die nicht nur zur Antikörperproduktion, sondern auch zur Aufrechterhaltung der inflammatorischen autoimmunen Reaktion beiträgt (Hjelmstrom 2001).

3.3.3 Modell einer T_H2 induzierten EAE

In einem neuartigen adoptiven T-Zell-Transfermodell bei immunkompetenten SJL-Mäusen kann eine EAE durch den Transfer klonaler CD4⁺ T_H2-Zellen induziert werden (Nessler 2005). Nach Immunisierung mit PLP139-151 in komplettem Freund-Adjuvans (CFA) erfolgte nach 11 Tagen die Entnahme der regionalen Lymphknoten sowie die Etablierung von T-Zell-Linien, aus denen mittels Limiting-Dilution-Verfahren CD4⁺ T-Zell-Klone generiert wurden, die hinsichtlich ihres T-Zell-Rezeptor V β -Ketten-Repertoires, ihrer antigenspezifischen Proliferation sowie ihres Zytokinmusters weiter charakterisiert wurden. Der hierbei etablierte T-Zell-Klon „3-3“ ist V β 2-positiv und besitzt ein typisches T_H2 Profil mit Sekretion von IL-4, IL-5, IL-10, nicht jedoch IFN- γ (Abb. 1).

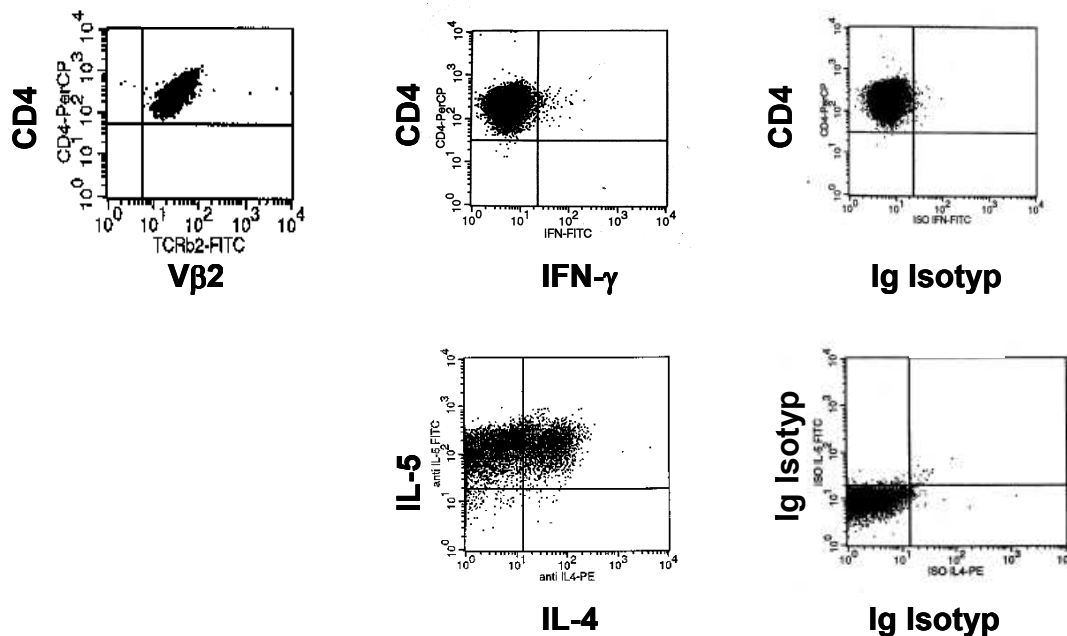


Abb. 1: Durchflusszytometrische Charakterisierung des T-Zell-Klons 3-3. Links oben: Der Klon ist CD4 und TCR V β 2-positiv. Mitte oben: IFN- γ ist nicht nachweisbar. Mitte unten: Die intrazelluläre Zytokinfärbung zeigt, dass der Klon IL-5 und zum Teil IL-4 positiv ist. Rechts oben/ unten: Isotypkontrollen für die jeweiligen Zytokine (mit freundlicher Genehmigung von Herrn Dr. S. Nessler, Göttingen, (Nessler 2005)).

Der adoptive Transfer klonaler „3-3“ T-Zellen kann in immunkompetenten SJL-Mäusen nach 10 bis 12 Tagen typische EAE-Symptome induzieren. Abbildung 2 stellt den klinischen EAE-Verlauf nach adoptivem Transfer von Zellen des T_H2-Klons 3-3 im Vergleich zum Verlauf nach adoptivem Transfer polyklonaler Lymphknotenzellen bzw. klonaler T_H1-Zellen dar. Entzündliche Läsionen in der frühen Erkrankungsphase werden von eosinophilen Granulolzyten sowie einer massiven

Immunglobulinablagerung dominiert. Neben einer ausgeprägten Demyelinisierung sind axonale Läsionen nachweisbar.

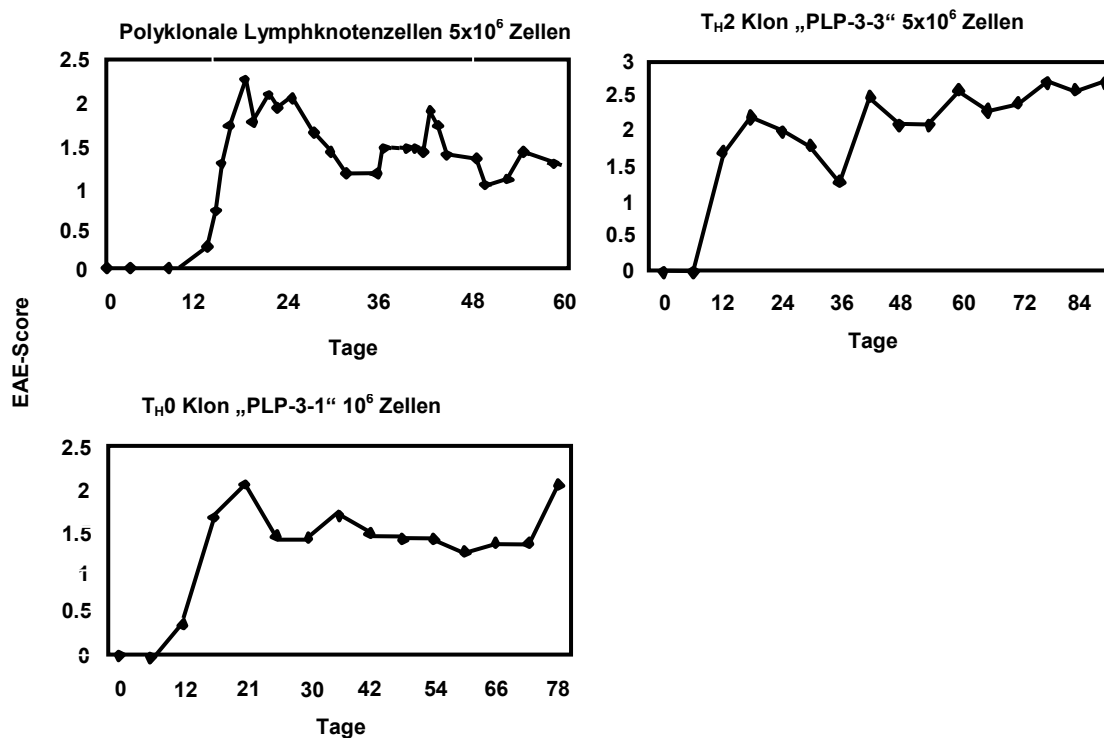


Abb. 2: EAE-Verlauf nach adoptivem Zell-Transfer bei SJL-Mäusen. Links oben: Transfer von 5×10^6 polyklonaler Lymphknotenzellen, gewonnen nach Immunisierung mit PLP 139-151. Rechts oben: Transfer von 5×10^6 Zellen des PLP 139-151 spezifischen T_H2 Klon 3-3. Links unten: Transfer von 10^6 Zellen des PLP 139-151 spezifischen T_H0 -Klon 3-1. Es zeigen sich unabhängig von der transferierten T-Zell-Population ähnliche Verläufe (mit freundlicher Genehmigung von Herrn Dr. S. Nessler, Göttingen, (Nessler 2005)).

Da die Mäuse nicht im ersten Erkrankungsschub sterben, ist eine Charakterisierung des chronischen EAE-Verlaufs möglich. Die histopathologische Untersuchung entzündlicher Läsionen in der chronischen Phase mehr als 90 Tage nach T-Zell-Transfer zeigt Infiltrate, welche durch Ablagerungen von B-Zellen, Plasmazellen und Makrophagen bei ausgeprägter Plaquebildung gekennzeichnet sind. Im Serum der Mäuse kann eine fokussierte, hochtitrige Antikörperantwort gegen PLP139-151 nachgewiesen werden.

Die dominierenden Isotypen im Serum der chronisch kranken Mäuse sind IgG1 und IgM, nicht jedoch IgG2a. Dies deutet zum einen auf eine T_H2 -Immunantwort in vivo, zum anderen auf die anhaltende Bedeutung B-Zell-vermittelter Effektormechanismen im chronischen Verlauf der demyelinisierenden Erkrankung hin (Nessler 2005) (Abb.3).

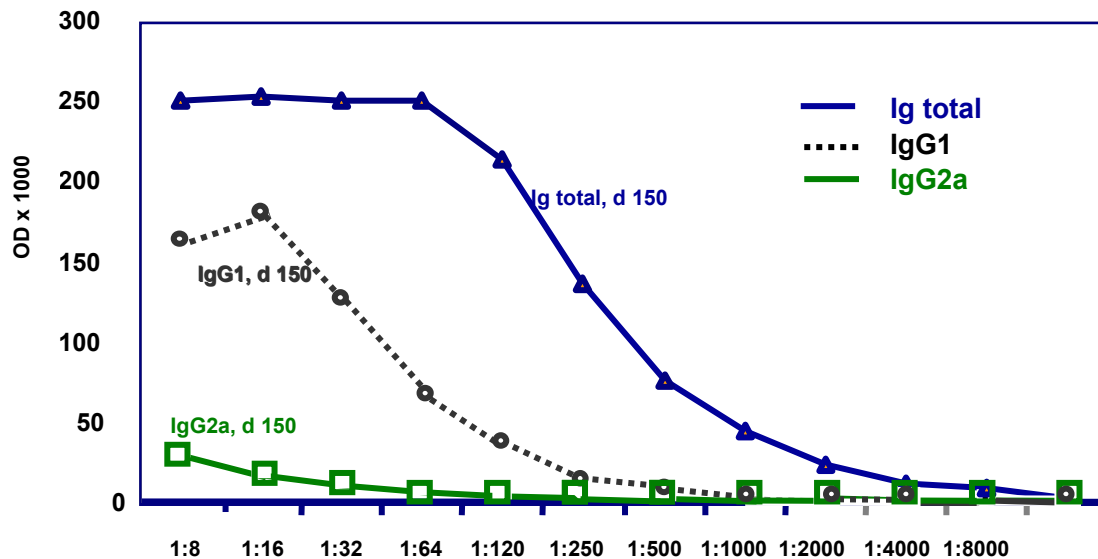


Abb. 3: Dargestellt sind die im ELISA bestimmten Serum-Antikörper gegen PLP 131-151 von Mäusen 150 Tage nach adoptivem Transfer von 5×10^6 Zellen des PLP 139-151 spezifischen T_H2 Klons 3-3. An Tag 150 nach Transfer ist hochtitrig das T_H2 -abhängige IgG1, deutlich weniger das T_H1 -abhängige IgG2a nachweisbar (mit freundlicher Genehmigung von Herrn Dr. S. Nessler, Göttingen).

Anders als bei anderen adoptiven T-Zell-Transfermodellen der EAE gelingt im hier beschriebenen Modell eine EAE-Induktion durch Transfer klonaler $CD4^+$ T_H2 T-Zellen in immunkompetente SJL-Mäuse. Im Gegensatz zur T_H1 oder T_H0 induzierten EAE fallen insbesondere in der chronischen Phase der Erkrankung, d.h. mehr als 90 Tage nach T-Zell-Transfer, entzündliche Infiltrate bestehend aus B-Zellen, Plasmazellen und Makrophagen sowie eine fokussierte hochtitrige Antikörperantwort v.a. gegen das Myelinpeptid PLP 139-151 im Serum auf, welches zur Immunisierung der Tiere verwendet wurde, aus denen im Verlauf die T-Zell-Klone generiert wurden.

Humorale Effektormechanismen scheinen in diesem EAE-Modell ähnlich wie beim histopathologischen Typ II der MS (Lucchinetti, et al. 2000) bzw. beim B-Zell-dominierten Liquorphänotyp der MS (Cepok, et al. 2001) eine wesentliche Rolle zu spielen.

3.4 Fragestellung der vorliegenden Arbeit

Die klinische Heterogenität der Multiplen Sklerose spiegelt sich in unterschiedlichen histopathologischen sowie liquorzytologischen Mustern wieder. Hierbei finden sich Subtypen, bei denen humorale Effektormechanismen eine wesentliche Rolle zu spielen scheinen.

Im hier beschriebenen EAE-Modell ist es gelungen, durch adoptiven Transfer klonaler CD4⁺ T_H2 Zellen bei immunkompetenten SJL-Mäusen eine EAE zu induzieren, deren klinischer Verlauf ähnlich dem einer T_H0 oder T_H1 induzierten EAE ist. Als wesentliches Charakteristikum der T_H2 induzierten EAE fallen insbesondere in der chronischen Phase der Erkrankung entzündliche Infiltrate mit Ablagerungen von Antikörpern, Plasmazellen und Makrophagen sowie eine im Vergleich zur T_H0 oder T_H1 induzierten EAE stärker akzentuierte Antikörperantwort auf (Nessler 2005).

Ziel der vorliegenden Arbeit ist eine Charakterisierung dieser Antikörperantwort.

Durch adoptiven Transfer von Zellen des PLP 139-151 spezifischen T-Zell-Klons 3-3 in immunkompetente SJL-Mäuse wurde eine EAE induziert. In der chronischen Phase der Erkrankung (ca. 90 Tage nach T-Zell-Transfer) wurden Milzzellen entnommen und mit Zellen der Sp2-Maus-Myelom-Zelllinie fusioniert. Primärkulturen mit Nachweis PLP 139-151 bzw. anderer Myelinpeptid spezifischer Antikörper wurden mittels Limiting-Dilution-Verfahren kloniert (Kohler, et al. 1975; Galfre, et al. 1977; Coller, et al. 1983). Aus den Zellkulturüberständen der Klone wurden monoklonale Antikörper durch chromatographische Aufreinigung gewonnen. **Die Besonderheit dieses Modells besteht darin, dass monoklonale Antikörper ohne vorherige aktive Immunisierung mit dem Myelinpeptid PLP 139-151 generiert wurden. Es handelt sich daher um einen neuen, vermeintlich physiologischeren Ansatz zur Charakterisierung der humoralen Immunantwort in einem EAE-Modell.**

Hierbei sollen insbesondere folgende Gesichtspunkte berücksichtigt werden:

1. Funktionelle Charakterisierung der monoklonalen Antikörper in ELISA, Western-Blot sowie an Gewebsschnitten.
2. Adoptive Transfer bzw. Co-Transferexperimente zur Klärung der Frage, ob ein Transfer monoklonaler PLP139-151 spezifischer Antikörper eine krankheitsinduzierende bzw. krankheitsmodifizierende Wirkung im EAE-SJL-Modell hat.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Versuchstiere

Für die Tierexperimente wurden weibliche Mäuse des Inzuchtstammes SJL/J (H-2^S) im Alter zwischen 7 und 10 Wochen verwendet, die von der Firma Harlan-Winkelmann (Harlan-Winkelmann, Borcheln, BRD) bezogen wurden.

Tierhaltung und Durchführung der Experimente erfolgte entsprechend den Richtlinien der Universität Marburg. Alle Tiere wurden in licht- und temperaturregulierten Räumen gehalten und erhielten Pressfutter und Wasser nach Belieben.

4.1.2 Antikörper

Die folgenden Tabelle bieten einen Überblick über die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Antikörper.

Spezifität	Markierung	Isotyp	Klon	Quelle
Antikörper spezifisch für Myelinpeptide bzw. -proteine bzw. Sekundärantikörper				
MBP 130-137	-	IgG1 (Maus)		Chemicon, Temecula, USA
MBP	-	polyklonal (Hase)		DAKO, Carpinteria, CA, USA
IgG (Hase)	HRP	polyklonal (Schaf)		Serotec, Düsseldorf, D
MOG	-	IgG1 (Maus)	8-18c5	C. Linington, Department of Neuroimmunology, Max Planck Institute for Neurobiology, Martinsried, D (Piddlesden, et al. 1993)
PLP, DM20	-	IgG2a (Maus)	plpc1	Biozol, Eching, D
Antikörper zur Isotypbestimmung muriner Antikörper				
IgG1	HRP	IgG1 (Ratte)	X56	BD Pharmingen, San José, CA, USA
IgG2a	HRP	IgG1 (Ratte)	R19-15	BD Pharmingen, San José, CA, USA
IgG2b	HRP	polyklonal (Ziege)		Southern Biotechnology, Birmingham, AL, USA
IgG3	HRP	polyklonal (Ziege)		Serotec, Düsseldorf, D
IgM	HRP	IgG2a (Ratte)	II/41	BD Pharmingen, San José, CA, USA
IgA	HRP	polyklonal (Ziege)		Serotec, Düsseldorf, D
IgE	HRP	IgG1 (Ratte)	LO-ME-3	Serotec, Düsseldorf, D
Murines IgG	HRP	polyklonal (Schaf)		Amersham Biosciences, Freiburg, D
Murine Immunglobuline	HRP	polyklonal (Ziege)		BD Pharmingen, San José, CA, USA
Isotypkontrollen für quantitative ELISAs und Transferexperimente				
TNP	-	IgG1	A111-3	BD Pharmingen, San José, CA, USA
TNP (natriumazidfrei)	-	IgG1	107.3	
TNP	-	IgG2b	C48-4	

Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Antikörper

4.1.3 Chemikalien und Substanzen

- Ammoniumchlorid (BD, Heidelberg, D)
- Ammoniumsulfat (Sigma, Deisenhofen, D)
- 4 – 12 % Bis-Tris Gel, NuPage®, 12 Taschen, 20 µl (Invitrogen, Paisley, UK)
- Calciumchlorid (hydratisiert) (Sigma, Deisenhofen, D)
- Carbonat-Bicarbonat-Kapseln (Sigma, Deisenhofen, D)
- Coomassie Brilliantblau R 250 (Bio-Rad, München, D)
- Dinatriumhydrogenphosphat (hydratisiert) (Sigma, Deisenhofen, D)
- DMSO (Sigma, Deisenhofen, D)
- 1 M DTT (Sigma, Deisenhofen, D)
- 0,5 M EDTA (Sigma, Deisenhofen, D)
- EGTA (Sigma, Deisenhofen, D)
- ECL western blotting detection reagents (Amersham Biosciences, Freiburg, D)
- Ethanol (Sigma, Deisenhofen, D)
- D-(+)-Glucose (Sigma, Deisenhofen, D)
- L-Glutamin (200 mM) (GIBCO, Paisley, UK)
- Glycin (Sigma, Deisenhofen, D)
- Harnstoff (Sigma, Deisenhofen, D)
- HAT (Hypoxanthin, Aminopterin, Thymidin) 50x Konzentrat (Boehringer, Mannheim, D)
- HEPES Buffer Solution (1 M) (GIBCO, Paisley, UK)
- Hyperfilm ECL (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, D)
- IFA (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA)
- IL-2 (R&D, Minneapolis, USA)
- Isopropanol (Sigma, Deisenhofen, D)
- Kaliumchlorid (Sigma, Deisenhofen, D)
- Kaliumdihydrogenphosphat (Sigma, Deisenhofen, D)
- Kaliumphosphat (Sigma, Deisenhofen, D)
- Ketanest ® / Ketamin (Pfizer, Karlsruhe, D)
- LDS 4X NuPAGE® Sample Buffer (Invitrogen, Paisley, UK)
- Magnesiumchlorid (hydratisiert) (Sigma, Deisenhofen, D)
- Magnesiumsulfat (hydratisiert) (Sigma, Deisenhofen, D)

- 2-Mercaptoethanol (Sigma, Deisenhofen, D)
- Methanol (Sigma, Deisenhofen, D)
- Mycobacterium tuberculosis H37RA (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA)
- Natriumazid (Merck, Darmstadt, D)
- Natriumchlorid (Sigma, Deisenhofen, D)
- Natriumphosphat (Sigma, Deisenhofen, D)
- Natrium-Pyruvat (100 mM) (GIBCO, Paisley, UK)
- MEM Non-essential Amino Acid Solution 100x (GIBCO, Paisley, UK)
- Paraformaldehyd (PFA) (Merck, Darmstadt, D)
- Polyethylenglykol (Serva, Heidelberg, D)
- Penicillin (10.000 U/ml) / Streptomycin (10.000 µg/ml) (GIBCO, Paisley, UK)
- PBS, 10-fach PBS (GIBCO, Paisley, UK)
- Peroxidase (KPL, Gaithersburgh, Maryland, USA)
- Phenolrot (Sigma, Deisenhofen, D)
- PMSF (Sigma, Deisenhofen, D)
- Ponceau S red staining solution (Sigma, Deisenhofen, D)
- PVDF-Membranen, Porengröße 0,45 µm (Invitrogen, Paisley, UK)
- Rompun® / Xylazin (Bayer, Monheim, D)
- Schwefelsäure (Sigma, Deisenhofen, D)
- SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard (Invitrogen, Paisley, UK)
- TMB Peroxidase Substrat (KPL, Gaithersburgh, Maryland, USA)
- 1M TrisHCl, pH 7,5 (Sigma, Deisenhofen, D)
- Triton X-100 (Sigma, Deisenhofen, D)
- Tween 20 (Sigma, Deisenhofen, D)

4.1.4 Chromatographiesäulen

- Protein G Sepharose® Fast Flow (10 ml) (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, D)
- HiTrap® affinity columns (1 ml) (IgM Purification) (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, D)

4.1.5 Geräte

- Dounce-Homogenisator (Braun, Melsungen, D)

- ELISA-Lesegerät Mikroplate Reader Revelation (Dynex, Chantilly / Virginia, USA)
- Elektrophoresekammer XCell-Mini-Cell® (Invitrogen, Paisley, UK)
- Finnpiquette (Thermo Electron Corporation, Waltham, USA)
- Glasgefäße (Schott, Mainz, D)
- Kulturschrank (Heraeus, Hanau, D)
- Laborkühlzentrifuge (Heraeus, Hanau, D)
- Lichtmikroskop Wilovert A (Hund, Wetzlar, D)
- Magnetrührer (Heidolph, Düsseldorf, D)
- pH Meter Portamess (Knick, Berlin, D)
- Pipetten (Eppendorf, Hamburg, D)
- Pipettierhilfe Accujet (Brand, Wertheim, D)
- Peristaltische Pumpe P-1 (Amersham Biosciences, Freiburg, D)
- Schüttler, Vortex MS2 Minishaker (IKA, Staufen, D)
- Shaker Duomax (Heidolph, Schwalbach, D)
- Sterilwerkbänke (Heraeus, Hanau, D)
- Ultraschallhomogenisator (Hielscher, Teltow, D)
- Waagen (Sartorius, Göttingen, D)
- Westernblot XCell II® Blot module und Schwämmchen (Invitrogen, Paisley, UK)
- Zählkammer nach Neubauer (Fein-Optik, Blankenburg, D)
- Zentrifuge 5415D (Eppendorf, Hamburg, D)
- Zentrifuge Megafuge 1.0R (Heraeus, Hanau, D)
- Zentrifuge Megafuge 1.0 (Heraeus, Hanau, D)
- Zentrifuge J6B (Beckman, München, D)

4.1.6 Lösungen und Puffer

Als Basis für alle Lösungen und Puffer wurden Aqua bidest (ddH₂O) (Braun, Melsungen, D) oder PBS (GIBCO, Paisley, UK) verwendet.

- **Generierung der B-Zell-Hybridome:**

HBSS-Puffer nach Hartmann

Calciumchlorid (hydratisiert) (0,185 g/l)
Dinatriumhydrogenphosphat (hydrat.) (0,23 g/l)
Glucose (1 g/l)
Kaliumchlorid (0,4 g/l)
Kaliumdihydrogenphosphat (0,06 g/l)
Magnesiumdichlorid (hydratisiert) (0,2 g/l)
Magnesiumsulfat (hydratisiert) (0,2 g/l)
Natriumchlorid (8 g/l)
Phenolrot (0,01 g/l)

- **Affinitätschromatographie mit Protein G Säulen:**

Bindungspuffer (= Dialysepuffer)	0,1 M Glycin, pH 8
Elutionspuffer	0,1 M Glycin, pH 2,7
Neutralisierungspuffer	1 M Tris-HCl, pH 9,0
Waschpuffer	70% Ethanol
Lagerungspuffer	20% Ethanol

- **Affinitätschromatographie mit dem HiTrap® Purification System:**

Bindungspuffer	20 mM Natriumphosphat 0,5 M Kaliumsulfat pH 7,5
Elutionspuffer	20 mM Natriumphosphat pH 7,5

Waschpuffer	20 mM Natriumphosphat 30 % Isopropanol
-------------	---

Lagerungspuffer	20 % Ethanol
-----------------	--------------

Alle für die Affinitätschromatographie verwendeten Puffer wurden mit Porengröße 0,2 µm filtriert.

- **ELISA**

Blockpuffer 1:	1% BSA in PBS
----------------	---------------

Blockpuffer 2:	1% BSA 5% Sucrose in PBS
----------------	-----------------------------

Beschichtungspuffer 1:	0,05 M Carbonat-Bicarbonatpuffer pH 9,6 (1 Carbonat-Bicarbonat Kapsel auf 100 ml Aqua bidest)
------------------------	--

Beschichtungspuffer 2	6 M Harnstoff in PBS
-----------------------	----------------------

Stopp Lösung:	1 M H ₂ SO ₄ in Aqua bidest
---------------	---

Waschpuffer:	250 µl TWEEN 20 in 500 ml PBS, pH 7,4
--------------	---------------------------------------

- **Proteinextraktion:**

Lysispuffer:	1 mM DTT 5 mM EDTA 2 mM EGTA (Sigma, Deisenhofen, D) 0,1 mM Leupeptin 140 mM NaCl 20 mM PIPES 0,3 mM PMSF 1 Proteaseinhibitortablette (Boehringer, Ingelheim, D) 10 mM Tris pH 7,5 1,5 % Triton X
--------------	--

- **SDS Page Elektrophorese und Western Blot**

Blockpuffer:	3% Milchpulver in TBS
Laufpuffer:	50 ml NuPage® SDS MES Running Buffer (Invitrogen, Paisley, UK) in 950 ml Aqua bidest
Transferpuffer:	50 ml NuPage® Transfer Puffer (Invitrogen, Paisley, UK) 100 ml Methanol 800 ml Aqua bidest
Tris-gepufferte Salzlösung (TBS):	50 mM Tris HCl 137 mM NaCl 2,7 mM KCl pH 8,0
Waschpuffer:	0,05% TWEEN 20 in TBS

4.1.7 Proteine und Peptide

- PLP 139-151 (Jerini, Berlin, D)
- MBP gesamt (Sigma, Deisenhofen, D)
- MOG 1-125 wurde freundlicherweise von Dr. D. Merkler (Institut für Neuropathologie, Universität Göttingen) zur Verfügung gestellt.

4.1.8 Testkits

- BCA® 200 Protein Assay Kit (Proteinbestimmung nach Bradford) (Pierce, Rockwood, USA)
- Quantitativer Maus IgM ELISA Kit (ZeptoMetrix, Buffalo, N.Y., USA)
- Quantitativer Maus IgG ELISA Kit (ZeptoMetrix, Buffalo, N.Y., USA)

4.1.9 Verbrauchsmaterial

- Dialyseschlauch (Serva Electrophoresis, Heidelberg, D)
- Flachbodenplatten, 96-Well (Nunc, Wiesbaden, D)
- Kryoröhrchen (Nunc, Wiesbaden, D)

- Mikrotiterplatte, 96 Vertiefungen (Nunc, Wiesbaden, D)
- Millipore Filtereinheiten (0,2µm, 0,45µm) (Pharmacia, Freiburg, D)
- Pipettenspitzen, blau, gelb (Sarstedt, Nümbrecht, D)
- Polystyrolrundbodenröhrchen, 15 ml, 50 ml (Greiner, Nürtingen, D)
- Reaktionsgefäße 0,5 ml (Eppendorf, Hamburg, D)
- Rundbodenplatten, 24-, 96-Wells (Greiner, Nürtingen, D)
- Sterilpipetten, wattiert, 25 ml, 10 ml, 5 ml (Greiner, Nürtingen, D)
- Ultraschallhomogenisator
- Zellkulturflaschen 500 ml, 250 ml, 50 ml (Greiner, Nürtingen, D)
- Zellkulturschalen (d = 10 cm) (Falcon, Oxnard, USA)
- Zentrifugenröhrchen, 50 ml (Greiner, Nürtingen, D)

4.1.10 Zellen

4.1.10.1 T-Zellen

Zur Induktion der EAE durch adoptiven Transfer und im Rahmen der Antikörpertransferexperimente wurden T-Zell-Klone verwendet, die zuvor in der Arbeitsgemeinschaft für Neuroimmunologie (Philipps-Universität Marburg) etabliert und mittels intrazellulärer Zytokinfärbung weiter charakterisiert worden waren (Nessler 2005) (Tab. 4).

T-Zell-Klon	TNF-α	IFN-γ	IL-4	IL-5	IL-10	Zytokinprofil
3-3	+	-	++	+++	++	Th2
cPLP 25	+++	+++	-	-	-	Th1

Tabelle 4: Verwendete T-Zell-Klone; +: 5-500 pg/ml, ++ 500-2000 pg/ml, +++ 2000-10000 pg/ml (Nessler 2005)

4.1.10.2 Myelomzellen

Murine Myelomzellen der Linie Sp2/0 wurden von Prof. Dr. K.U. Hartmann (Institut für Experimentelle Immunologie, Philipps-Universität Marburg) freundlicherweise zur Verfügung gestellt (Shulman, et al. 1978).

4.1.11 Zellkulturmedium und Mediumzusätze

Zellkulturmedium für T-Zellen

500 ml RPMI 1640 (Sigma, Deisenhofen, D) wurden mit folgenden Zusätzen supplementiert:

- 10% FCS (Fötales Kälberserum) (Sigma, Deisenhofen, D)
- 2 mM L-Glutamin
- 1 mM Natrium-Pyruvat

- 5 ml Nichtessentielle Aminosäuren 100x
- Penicillin (100 U/ml) / Streptomycin (100 µg/ml) (GIBCO, Paisley, UK)
- 12,5 mM HEPES-Puffer
- 50µM 2-Mercaptoethanol

Stimulation der T-Zellen:

- IL-2 (R&D, Minneapolis, USA)

Fusionsmedium:

- HBSS
- 50% PEG 4000 (Polyethylenglykol)
- 5 % DMSO

HAT-Selektionsmedium

- HAT (Hypoxanthin, Aminopterin, Thymidin) 50 x Konzentrat
- Verdünnung 1:50 in Hybridommedium

HT-Selektionsmedium

- HT (Hypoxanthin, Thymidin) 50x Konzentrat
- Verdünnung 1:50 in Hybridommedium

Zellkulturmedium für Sp-2 Myelomzellen und B-Zell-Hybridome

500 ml RPMI 1640 wurden mit folgenden Zusätzen supplementiert:

- Sp-2 Medium: 10% FCS (Fötales Kälberserum) (Sigma, Deisenhofen, D)
- Hybridommedium: Ultra low IgG (GIBCO, Paisley, UK)
- 2 mM L-Glutamin (2 mM)
- 1 mM Natrium-Pyruvat
- 5 ml Nichtessentielle Aminosäuren
- Penicillin (100 U/ml) / Streptomycin (100 µg/ml)

4.2 Methoden

4.2.1 Etablierung von B-Zell-Hybridomen

Zum besseren Verständnis wird im Folgenden beschrieben, wie die im Rahmen der Arbeit verwendeten von Herrn Dr. S. Nessler zur Verfügung gestellten Hybridomzelllinien bzw. Primärkulturen hergestellt wurden.

4.2.1.1 Immunisierungsprotokoll und Etablierung von T-Zelllinien

Zur Immunisierung erhielten weibliche SJL-Mäuse vier subkutane Injektionen von jeweils 25 µg PLP 139-151 in 50 µl CFA-Emulsion im Bereich der inguinalen und axillären Lymphknoten. Elf Tage später wurden die Tiere zur sterilen Entnahme der inguinalen und axillären Lymphknoten durch CO₂-Begasung getötet. Die Lymphknoten wurden anschließend durch ein feinmaschiges Netz passiert, in supplementiertem T-Zell-Medium gelöst und gewaschen. Nach Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer wurden die Lymphknotenzellen mit Medium auf eine Konzentration von 3 Millionen Zellen pro Milliliter eingestellt und mit PLP139-151 (10µg / ml) in 24-Napf-Platten (2 ml / Napf) bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert (modifiziert nach (Racke, et al. 1991)).

Nach vier Tagen wurde die Zellkultur erstmals expandiert. Hierbei wurde der Inhalt eines Napfes unter Zugabe von je einem Milliliter Zellkulturmedium auf zwei verteilt und mit IL-2 (2 ng/ml) und PLP 130-151 stimuliert. Im weiteren Verlauf wurde die Zellkultur in wöchentlichem Abstand unter gleichem Vorgehen expandiert.

4.2.1.2 T-Zellklonierung

Die Zelllinien wurden zwei bis drei Wochen nach Ansatz der Kultur mit dem „limiting dilution“ Verfahren kloniert. Zur Präparation antigenpräsentierender Stimulatorzellen wurde syngeneten Tieren unter sterilen Bedingungen die Milz entnommen, mit 30 Gy bestrahlt und durch ein feinmaschiges Sieb passiert. In der Milzzellsuspension enthaltene Erythrozyten wurden mit 0,86% Ammoniumchloridlösung lysiert. Anschließend wurde die Zellsuspension 2 – 3-mal mit Medium gewaschen und auf eine Konzentration von 4 Mio/ml eingestellt. Für eine Klonierung wurden je 6 T-Zellsuspensionen in supplementiertem Medium in absteigender Konzentration angesetzt: 3000 T-Zellen pro ml, 1000 T-Zellen pro ml, 300 T-Zellen pro ml, 100 T-Zellen pro ml, 30 T-Zellen pro ml und 10 T-Zellen pro ml. Je 100 µl der T-Zellsuspensionen wurden mit 100 µl der Stimulatorzellsuspension in je eine Vertiefung einer 96-Napf-Rundbodenplatte pipettiert und mit PLP 130-151 (10µg/ml) und IL-2 (2ng/ml) stimuliert und für eine Woche im Inkubator kultiviert. Nach Zugabe der

gleichen Menge an Stimulatorzellen, PLP-Peptid und IL-2 pro Well wurden die Zellen für 7 weitere Tage kultiviert.

Das Zellwachstum wurde mehrmals wöchentlich mikroskopisch kontrolliert. Deutete die Morphologie auf klonales Wachstum hin, wurden die Zellklone in 24-Napf-Platten überführt und analog einer Zelllinie unter Stimulation mit PLP-Peptid, IL-2 und antigenpräsentierenden Zellen weiterkultiviert. Nach Bestimmung der exprimierten V β -Kette mittels FACS wurde zum Beweis der Klonalität eine Sequenzierung des jeweiligen T-Zell-Rezeptors durchgeführt (Nessler 2005).

4.2.1.3 EAE-Induktion durch adoptiven T-Zell-Transfer

Für den T-Zell-Transfer wurden PLP-Peptid-spezifische, aktivierte klonale T-Zellen verwendet, die zuvor über 72 – 96 Stunden mit 10 μ g/ml PLP 139-151 und antigenpräsentierenden Zellen stimuliert worden waren. Die T-Zellen wurden vor dem Transfer gewaschen und in PBS aufgenommen. Zur Induktion einer EAE erhielten weibliche SJL-Mäuse eine intraperitoneale Injektion von 1 bis 5 Millionen klonaler in 300 μ l PBS gelöster T-Zellen. Die EAE wurde bei den SJL-Mäusen mit folgendem klinischen Score bewertet (Tab. 5):

0	keine Auffälligkeiten
1	Schwanzparese
2	zusätzlich Parese der Hinterpfoten oder Ataxie
3	mittelgradige Parese der Hinterpfoten, deutliche Einschränkung beim Klettern
4	Paraplegie oder Tetraparese
5	Moribund

Tabelle 5: EAE-Score

4.2.1.4 Fusion: Generierung von Hybridomzellen

Die Sp2-Myelomzellen wurden in Myelom-/Hybridommedium kultiviert (Shulman, et al. 1978). Eine Woche vor der Fusion wurde die Zellkultur täglich expandiert. Hierzu wurden die Zellen in einer Konzentration von 10^5 pro Milliliter in Petrischalen ausgesät. Zum Zeitpunkt der Fusion sollten sich die Myelomzellen in der Wachstumsphase befinden.

Ein Tag vor der Fusion wurden Peritonealmakrophagen aus SJL-Mäusen als Feederzellen steril präpariert. Hierzu wurden die Mäuse durch CO₂-Begasung getötet, deren Bauchhöhle unter aseptischen Bedingungen eröffnet und mit PBS gespült. Die lavagierten Zellen wurden gezählt, in Myelom-/Hybridommedium auf eine Konzentration von 10^5 pro Milliliter eingestellt und auf 96-Napf Mikrotiterplatten ausgesät (100 μ l pro Napf).

Am Tag der Fusion wurden Mäuse, die 96 Tage zuvor einen Transfer klonaler 3-3 T-Zellen erhalten hatten und bei denen hierdurch eine chronisch schubförmige EAE

induziert worden war, getötet. Anschließend wurde deren Milz präpariert, durch ein Sieb passiert, 2-mal mit HBSS-Puffer gewaschen und in serumfreiem Myelom-/Hybridommedium aufgenommen. Die Myelomzellen wurden ebenfalls gewaschen und in serumfreiem Medium aufgenommen.

Durch Fusion von Lymphozyten und Myelomzellen entstehen Zellhybride, sog. Hybridome. Die Fusionierung der Zellen ist ein seltenes Ereignis, dessen Häufigkeit durch die Zugabe von Polyethylenglykol erhöht wird. Die PEG-Fusion von Milz- und Myelomzellen wurde wie folgt durchgeführt (Kohler, et al. 1975; Galfre, et al. 1977):

- Milz- und Myelomzellen wurden im Verhältnis 10:1 gemischt, zentrifugiert und vorsichtig in 1,5 ml Fusionsmedium in Lösung genommen.
- Nach 1,5 Minuten erfolgte über einen Zeitraum von einer Minute die langsame Zugabe von 1 ml HBSS.
- Anschließend wurden während 3,5 Minuten 10 ml HBSS zur Zellsuspension hinzugegeben.
- Im nächsten Schritt wurden während 4 Minuten 10 ml HBSS hinzugegeben.
- 10 Minuten nach Beginn der Verdünnung wurde die Zellsuspension zentrifugiert (7 min bei 800 rpm) und das Zellpellet in HAT-Selektionsmedium gelöst.

Die Hybridomzellsuspension wurde nun in die am Vortag durch Beschichtung mit Feeder-Zellen vorbereiteten Näpfe der entsprechenden Mikrotiterplatten ausgesät (100 µl Zellsuspension pro Napf). Am 10. Tag nach der Fusion erfolgte der erste Mediumwechsel mit HT-Medium.

4.2.1.5 Screening und Auswahl von Hybridomzellen

Das Screening diente der Erfassung von Hybridomzellen, die Antikörper gegen das PLP-Peptid 139-151 herstellten. Hierzu wurde zwei Tage nach dem Mediumwechsel Zellkulturüberstand aus den Näpfen entnommen, in denen es zu Zellwachstum gekommen war. Der Test auf Antikörperproduktion erfolgte mit einem PLP-Peptid-gecoateten ELISA (siehe Abschnitt 2.2.5). Antikörperproduzierende Hybridomzellen wurden nun in 24-Napf-Platten überführt und weiterkultiviert. Einige Tage später erfolgte die Klonierung der Primärkulturen nach dem „limiting dilution“ Verfahren. Durch Grenzverdünnung wurde die Konzentration der Zellen im Kulturmedium so gesenkt, dass in je 2 Näpfen statistisch eine Zelle vorkam. Die Zellsuspension wurde in mit Feeder-Zellen beschichtete Näpfe von 96-well Flachboden-Mikrotiterplatten ausgesät (100 µl pro Napf). Nach zweimaliger Reklonierung finden sich auf diese Weise mit höherer Wahrscheinlichkeit Zellklone, mit denen monoklonale Antikörper produziert

werden können (Coller, et al. 1983). Die Antikörperproduktion der Klone wurde mit einem PLP-Peptid-gecoateten ELISA kontrolliert.

4.2.1.6 Gefrierkonservierung von Zellen

Ziel der Gefrierkonservierung ist die Langzeitlagerung von Zellen bei einer Temperatur von -140°C unter weitgehend erhaltener Vitalität der Zellen.

Vor dem Einfrieren befanden sich die Zellen in einer Phase exponentiellen Wachstums. Um während des Einfrierprozesses eine mechanische Zerstörung durch intrazelluläre Kristallbildung zu vermeiden, wurde ein Einfriermedium verwendet, welches das membrangängige Frostschutzmittel DMSO enthielt. Nach Zellzahlbestimmung wurde die Zellkultursuspension für 10 min bei 1500 rpm zentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstandes wurde das Zellpellet in einem definierten Volumen des gekühlten Hybridomzellmediums mit 40% FCS wieder in Lösung genommen. Über einen Zeitraum von mehreren Minuten wurde das gleiche Volumen einer 20%-igen DMSO-Hybridomzellmedium-Lösung zur Zellsuspension hinzugegeben. Alle Arbeitsschritte erfolgten mit gekühlten Reagenzien auf Eis. Anschließend wurde die Zellsuspension aliquotiert und in vorgekühlten Kryoröhrchen für 2 Tage bei -80°C in einer Styroporbox gelagert. Die Langzeitlagerung der Röhrchen erfolgte in einer Kryobox bei einer Temperatur von -140°C .

4.2.1.7 Auftauen

Zum Auftauen der Zellen wurde das entsprechende Kryoröhrchen unter vorsichtigem Schwenken in einem Wasserbad (37°C) vorsichtig erwärmt. Anschließend wurde die Zellsuspension rasch in ein vorbereitetes Zentrifugenröhrchen mit kaltem Hybridomzellmedium gegeben und mit 1500 rpm für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde wieder in Lösung genommen, die Zellsuspension noch 2-mal erneut zentrifugiert und wieder resuspendiert, bevor sie auf Zellkulturflaschen verteilt wurde.

4.2.2 Antikörperproduktion mit Hybridomzellkultur

Die Anzucht der Antikörper produzierenden Hybridomzellen erfolgte in mit 10% FCS supplementiertem Hybridomzellmedium. Nach je 2 – 3 Tagen im Inkubator bei 37°C und 5% CO_2 wurde der Inhalt jeweils einer gut bewachsenen großen Kulturflasche (200 ml) auf 5 Flaschen verteilt und die Kultur auf diese Weise rasch expandiert. Im letzten Schritt wurden in 50 Zellkulturflaschen je 15 ml einer Zellsuspension auf 60 ml Medium verteilt, welches jetzt nur noch mit 5 % FCS supplementiert wurde.

Nachdem sich das Medium nach ca. 6 Tagen von rot nach gelb verfärbt hatte und die Vitalität der Kultur abnahm, wurde der Kulturüberstand (Gesamtvolumen ca. 3,5 l) zellfrei zentrifugiert (2000 rpm, 10 min) und in einem Glasgefäß gesammelt.

4.2.3 Ammoniumsulfatfällung und Dialyse

Zur Konzentrierung der Antikörper in einem geringeren Volumen wurde der Zellkulturüberstand mit Ammoniumsulfat gefällt. Um eine 50-%ige Sättigung des Überstandes zu erreichen, wurden bei Raumtemperatur 313 g Ammoniumsulfat pro Liter unter Rühren so langsam hinzugegeben, dass sich das Ammoniumsulfat zwischendurch vollständig lösen konnte. Die Ammoniumsulfatlösung wurde nun über Nacht zur Präzipitation unter ständigem langsamen Rühren auf einem Magnetrührer im Kühlraum gelagert.

Am nächsten Tag wurde die Ammoniumsulfatlösung bei 10.000 g in einer Kühlzentrifuge für 30 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und die Pellets mit einer möglichst geringen Menge 10-fach konzentriertem PBS (pH 8,2) wieder in Lösung gebracht. Das Gesamtvolumen des Antikörperkonzentrats betrug zuletzt ca. 40 ml.

Zum Pufferaustausch und zur Entsalzung der Antikörperlösung wurde diese im nächsten Schritt gegen den bei der nachfolgenden Affinitätschromatographie verwendeten Bindungspuffer dialysiert. Zur Vorbehandlung wurden die verwendeten Dialyseschläuche für 1 Stunde in PBS auf einem beheizbaren Magnetrührer abgekocht und anschließend mehrfach mit Aqua bidest gründlich gespült. Der Dialyseschlauch wurde nun an einem Ende verknotet, über einen Glastrichter mit der Antikörperlösung befüllt und anschließend verschlossen. Hierbei wurde darauf geachtet, dass der Schlauch genug Platz für eine Volumenausdehnung um 100 % bot. Die Dialyse erfolgte für je 2 Stunden unter ständigem Rühren gegen 2 Liter des Bindungspuffers. Der Puffer wurde insgesamt 5-mal ausgetauscht. Zu Vorbereitung auf die Dialyse wurde das Dialysat zunächst mit 0,45 µm Porengröße, dann mit 0,2 µm Porengröße unter sterilen Bedingungen filtriert und anschließend im Kühlschrank aufbewahrt.

4.2.4 Aufreinigung der murinen monoklonalen Antikörper

4.2.4.1 Aufreinigung mittels Protein G Affinitätschromatographie

Die Aufreinigung muriner monoklonaler Antikörper der Isotypen IgG1 und IgG2b erfolgte mittels Protein G Affinitätschromatographie. Protein G ist ein Typ III Fc-Rezeptor, der an der Zelloberfläche von Streptokokken der Gruppe G exprimiert wird

und bindet ähnlich wie Protein A an die Fc-Region von IgG (Akerstrom, et al. 1985). Als Ligand fand eine rekombinante Form von Protein G ohne Albumin-bindende Region und mit 2 Fc-Rezeptoren Verwendung.

Das Antikörperkonzentrat war zuvor durch Dialyse auf eine Konzentration von 0,1 M Glycin und einen pH von 8 eingestellt worden. Alle Puffer und die Säulen wurden vor Verwendung zunächst auf Raumtemperatur gebracht. Nach Equilibrierung der Säule mit 60 ml Bindungspuffer wurde das Antikörperkonzentrat mit einer Flussgeschwindigkeit von ca. 0,5 ml/min auf die Säule aufgetragen. Anschließend erfolgte eine Spülung der Säule mit 30 ml Bindungspuffer mit einer Geschwindigkeit von 0,5 ml/min. Zur Elution der Antikörper wurde die Säule mit 40 ml Elutionspuffer (pH 2,7) gespült. Das Eluat wurde in Fraktionen zu je einem Milliliter in verschließbaren Polystyrolröhrchen aufgefangen, in denen zuvor zur Neutralisierung des pH-Wertes des Elutionspuffers je 100 µl des Neutralisierungspuffers (pH 9) vorgelegt worden waren. Zum Abschluss erfolgte eine Spülung der Säule mit 50 ml Reinigungspuffer sowie 15 ml Lagerungspuffer.

4.2.4.2 Aufreinigung mittels HiTrap® IgM Affinitätschromatographie

Zur Aufreinigung muriner monoklonaler Antikörper vom Isotyp IgM wurden HiTrap Chromatographiesäulen verwendet, bei denen an Sepharose gebundenes 2-Mercaptopryidin als Ligand fungiert. Als Mechanismus der Wechselwirkung zwischen Ligand und Antikörper wird eine gemischt hydrophil-hydrophobe Interaktion diskutiert (Finger, et al. 1996).

Das Antikörperkonzentrat war zuvor gegen 20 mM Natriumphosphat (pH 7,5) dialysiert worden. In kleinen Mengen wurde nun unter ständigem Rühren Kaliumsulfat hinzugegeben, bis eine 0,5 M Lösung erreicht war. Der weitere Ablauf erfolgte analog zur Protein G Affinitätschromatographie mit denen für das HiTrap System empfohlenen Puffern. Da die Säule nur ein Volumen von 1 ml besaß, waren entsprechend geringere Mengen zu Equilibrierung und Spülung der Säule erforderlich. Die Elution wurde hierbei nicht durch eine pH Wert Veränderung, sondern durch die unterschiedlichen Konzentrationen von Kaliumsulfat in Bindungs- und Elutionspuffer bewirkt, so dass keine anschließende Neutralisierung des Eluats erforderlich war.

4.2.5 Sandwich-ELISA

Die semiquantitative Detektion myelinspezifischer Antikörper in Zellkulturüberständen und Seren erfolgte mittels eines Sandwich-ELISAs (Kenny, et al. 1983). Hierzu wurden alle Peptide bzw. Proteine (mit Ausnahme von MOG 1-125) in einer Konzentration von

10 µg/ml in Beschichtungspuffer 1 gelöst. MOG 1-125 wurde in einer Konzentration von 0,2 µg in Beschichtungspuffer 2 gelöst.

In einem ersten Schritt erfolgte die Beschichtung der Näpfe einer 96-well Mikrotiterplatte durch Inkubation mit 100 µl der jeweiligen Peptid- bzw. Proteinlösung bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer über Nacht. Anschließend wurden die Näpfe mit jeweils 200 µl Waschpuffer 5-mal gewaschen und gründlich ausgeklopft. Zur Absättigung der noch vorhandenen Bindungsstellen wurden die Näpfe mit 200 µl Blockpuffer 1 für zwei Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert und erneut gewaschen. Für den mit MOG 1-125 beschichteten ELISA wurde für alle Schritte Blockpuffer 2 verwendet.

Die zu testenden Zellkulturüberstände bzw. Seren wurden in Falcon-Tubes im Verhältnis von 1:10 bis 1:10.000 im jeweiligen Blockpuffer verdünnt. Im Anschluss wurden pro Napf jeweils 100 µl dieser Verdünnungsreihen aufgetragen und bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer für zwei Stunden inkubiert.

Im Anschluss an fünfmaliges Waschen wurden je 100 µl eines polyklonalen HRP-gekoppelten anti-Maus-Immunglobulin-Antikörpers in einer Verdünnung von 1:1000 in Blockpuffer für zwei Stunden aufgetragen.

Nach erneutem Waschen erfolgte die Zugabe von je 100 µl einer zuvor nach Herstellerprotokoll im Verhältnis 1:1 gemischten Lösung aus TMB-Substrat und Wasserstoffperoxid. Eine positive Immunreaktivität war durch eine zunehmende blaue Färbung gekennzeichnet. Nach 15 Minuten in einer dunklen Kammer wurde die Reaktion durch Zugabe der Stopplösung beendet und durch photometrische Messung der optischen Dichte bei 450 nm Wellenlänge in einem ELISA-Lesegerät ausgewertet. Die quantitative Bestimmung muriner Antikörper erfolgte mit hierfür vorgesehen Test-Kits der Firma Zeptometrix entsprechend der Herstellerangaben.

4.2.6 Proteinextraktion aus ZNS-Gewebe von SJL-Mäusen

Zunächst erhielten 2 SJL-Mäuse eine tödliche Dosis (40 µl) eines Ketanest®-Rompun®-Gemischs (Verhältnis 2:8). Anschließend wurde der Brustkorb eröffnet, eine Kanüle in die linke Herzkammer eingebracht und der rechte Vorhof eröffnet, so dass die Mäuse antegrad mit PBS für 5 Minuten perfundiert werden konnten.

Alle Schritte der Extraktion erfolgten mit vorgekühlten Geräten und Reagenzien bzw. auf Eis. Das Rückenmarksgewebe wurde nach Eröffnung der Wirbelsäule zügig herauspräpariert, sofort mit ca. 5ml Lysispuffer in einen Dounce-Homogenisator aus Glas gegeben und zermörsert (Eckert W.A., et al. 1997). Anschließend wurde das

Puffer-Gewebe-Gemisch mit Hilfe eines Ultraschallgeräts (30 s, Cycle 5) weiter homogenisiert. Das Homogenat wurde in einer Kühlzentrifuge bei 4°C 15 min mit 13.000 rpm zentrifugiert, der Überstand abpipetiert, in Eppendorf Cups aliquotiert und bei – 80 °C eingefroren.

Die Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration erfolgte nach der Methode von Bradford mit einem Proteinbestimmungskit der Firma Pierce.

4.2.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die extrahierten Proteine wurden mit einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese in 4 - 12 % Bis-Tris Gradientengelen unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt. Oligomere Proteine werden hierbei durch das im Probenpuffer enthaltene anionische Detergens Lithium-Dodecyl-Sulfat (LDS) in ihre Untereinheiten zerlegt und denaturiert. LDS-Moleküle binden an die entfalteten Peptidketten und verleihen ihnen eine stark negative Ladung. Hierdurch wird es möglich, die Proteine unabhängig von ihrer Ladung entsprechend ihres Molekulargewichtes aufzutrennen.

Zur Vorbereitung der Proben wurde die Proteinlösung im Verhältnis 3:1 mit LDS NuPage® Probenpuffer vermischt und für 10 Minuten bei einer Temperatur von 70°C inkubiert. Die XCell-Mini-Cell Elektrophorese-Kammer wurde entsprechend der Herstellerangaben zusammengebaut und mit Laufpuffer gefüllt. Anschließend wurden je 20µl der denaturierten Protein-LDS-Lösung in die zuvor mit MES-Laufpuffer gespülten Probentaschen des NuPage® Bis-Tris-Gels pipettiert und während 30 Minuten bei einer Spannung von 200 V aufgetrennt. Parallel hierzu wurde das Proteinstandardgemisch SeeBlue® Plus2 aufgetragen und ebenfalls aufgetrennt. Zur Darstellung der Proteine im Gel wurde das Gel 1 Stunde in Coomassieblue-Lösung gefärbt und anschließend für 2 Stunden in Aqua dest entfärbt.

4.2.8 Western Blot (Proteintransfer auf PVDF-Membranen)

Nach der Auftrennung durch die SDS-PAGE sind die Proteine immer noch stark negativ geladen und können in einem elektrischen Feld mit der Semidry-Methode aus dem Gel auf eine anodenwärts gelegene proteinbindende PVDF-Membran transferiert werden. Beim Semidryverfahren befinden sich Gel und Membran zwischen Filterpapier und Kompressionsschwämmen in einer mit Transferpuffer gefüllten Kammer.

Die PVDF-Membran (Porengröße 0,45 µm) wurde kurz vor Zusammenbau der Kammer für 30 Sekunden in Methanol eingelegt und anschließend mit Aqua dest gespült. Dann wurden Kompressionsschwämme, Filterpapier und PVDF-Membran für

einige Minuten in Transferpuffer eingelegt, bis diese mit Pufferflüssigkeit vollgesogen waren. Anschließend wurden alle Komponenten entsprechend Abbildung 5 unter ständiger Benetzung mit Transferpuffer luftblasenfrei aufeinander geschichtet, die Kammer nach Herstellerangaben zusammengebaut und mit Transferpuffer gefüllt. Der Proteintransfer erfolgte mit einer Spannung von 30 V über eine Stunde.

Zur Überprüfung der Effizienz des Proteintransfers wurde ein Teil der PVDF-Membran in der Färbelösung Ponceau-Rot für 5 Minuten auf leichter Bewegung inkubiert und anschließend für 2 Minuten in Aqua dest gespült.

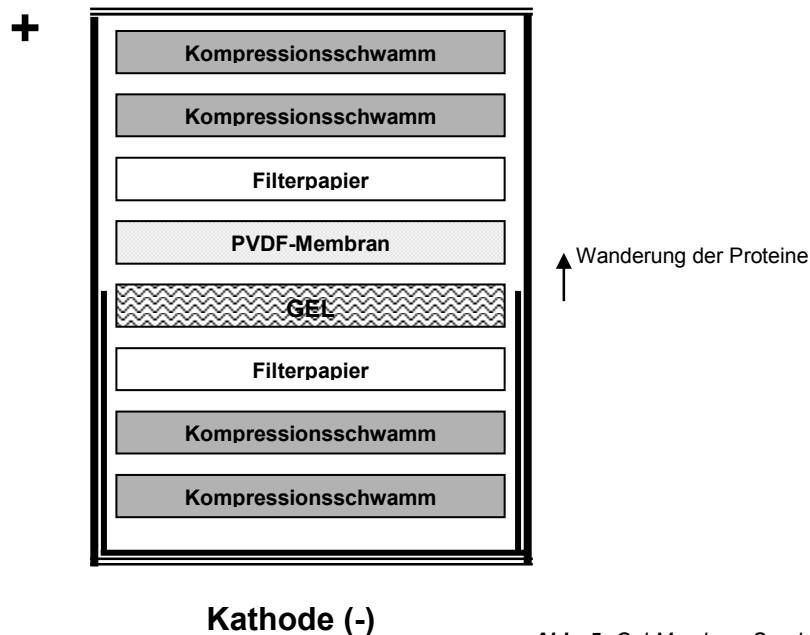


Abb. 5: Gel-Membran-Sandwich
(modifiziert nach Invitrogen,
Paisley, UK)

4.2.9 Immunologischer Nachweis der transferierten Proteine

Nach dem Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran wurde diese zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für eine Stunde bei Raumtemperatur in Blockpuffer (3% Magermilchpulver in TBS) inkubiert.

Anschließend wurde die Membran über Nacht unter beständiger langsamer Bewegung mit den in Blockpuffer gelösten Primärantikörpern inkubiert, wobei die Verdünnung der Primärantikörper vom jeweiligen Antikörper und dessen Präparation (aufgereinigt oder aus Zellkulturüberstand) abhängig war. Zum Nachweis der extrahierten Myelinproteine wurden Antikörper mit einer bereits nachgewiesenen Reaktivität gegen PLP, MBP und MOG als Primärantikörper verwendet. Zur Charakterisierung der Reaktivität der zuvor mit Hilfe der Hybridomzellkultur gewonnenen Antikörper gegenüber Myelinproteinen

wurden sowohl Hybridomzellkulturüberstände als auch aufgereinigte Antikörper als Primärantikörper eingesetzt.

Die Membran wurde anschließend gründlich für 3-mal 10 Minuten mit Waschpuffer unter ständiger Bewegung gewaschen, danach mit dem in Blockpuffer in einer Verdünnung von 1:2000 gelösten mit Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase gekoppelten Sekundärantikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und erneut gründlich gewaschen.

Um auch schwache Immunreaktivitäten erfassen zu können, wurde zur Detektion der Sekundärantikörper das sensitive ECL-System gewählt und entsprechend der Herstellerangaben verwendet. Diese Methode basiert auf einer peroxidasekatalysierten Oxidation von Luminol unter alkalischen Bedingungen in Gegenwart von Wasserstoffperoxid. Direkt nach der Oxidation befindet sich das Luminol in einem angeregten Zustand. Durch die Emission von Licht kehrt es wieder in den energetischen Ausgangszustand zurück. Das Maximum der Strahlungsintensität liegt bei einer Wellenlänge von 428 nm und wird 5 – 10 Minuten nach Beginn der Inkubation erreicht. Die Strahlungsintensität nimmt danach langsam mit einer Halbwertszeit von 60 Minuten wieder ab. Durch die Zugabe von Phenol zur Luminolreaktion wird die Lichtemission um das 1000-fache gesteigert (Whitehead, et al. 1979).

Die PVDF-Membran wurde für eine Minute mit der ECL-Detektionslösung inkubiert. Nach Abtupfen überschüssiger Detektionslösung wurde die Membran luftblasenfrei in Folie verpackt und in eine Filmkassette gelegt. Die lumineszierende Bande wurde in der Dunkelkammer durch Belichtung eines Autoradiographiefilms (Hyperfilm ECL) detektiert. Die hierbei gewählte Belichtungsdauer war sehr variabel und abhängig von den verwendeten Primärantikörpern. In der Regel wurden mehrere Belichtungen mit einer Dauer von 1 Sekunde bis hin zu 10 Minuten durchgeführt.

4.2.10 Transfereperimente

Alle Transferversuche wurden mit Tieren weiblichen Tieren des Inzuchtstammes SJL durchgeführt. Eine detaillierte Beschreibung des Ablaufs findet sich im Ergebnisteil.

4.2.11 Immunhistochemie

Die Vorbereitung und Perfusion der Mäuse erfolgte zunächst analog zum in Abschnitt 2.2.10 beschriebenen Vorgehen. Im Anschluss wurden die Mäuse für 10 – 15 Minuten zur Fixierung mit 4% PFA in PBS perfundiert. Rückenmark und Gehirn wurden nach der Fixierung entnommen. Die weitere histologische Aufarbeitung und Auswertung erfolgte durch Prof. Dr. med. C. Stadelmann-Nessler im Institut für Neuropathologie des Klinikums der Georg-August-Universität in Göttingen.

Die quantitative Auswertung der Läsionsflächen erfolgte ebenfalls durch Frau Prof. Dr. med. C. Stadelmann-Nessler (Merkler, et al. 2006). Digitale Bilder der Gewebsschnitte wurden hierzu über ein Lichtmikroskop (Olympus optical Co.LTD) mittels einer CCD-Kamera (Color View II, Soft imaging System®, Münster) angefertigt. Die Quantifizierung erfolgte durch systematische Anfertigung von 10 Übersichtsaufnahmen ($> 2.0 \times 10^8 \mu\text{m}^2$) unabhängig vom Vorhandensein einer Demyelinisierung im entsprechenden Abschnitt. Die geblindete Datenanalyse erfolgte mittels GraphPad Prism Version 4.00 für Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

4.2.12 Statistik

Zur Überprüfung der Signifikanz der gewonnenen Daten wurde der t-Test für unverbundene Stichproben verwendet (Weiß 2010).

5 Ergebnisse

5.1 Aufreinigung monoklonaler PLP 139-151 spezifischer Antikörper

Zur weiteren Charakterisierung der Antikörperantwort nach adoptivem Transfer klonaler 3-3 T_H2-Zellen erfolgte die Generierung antikörperproduzierender Hybridomzellen (Abbildung 6).

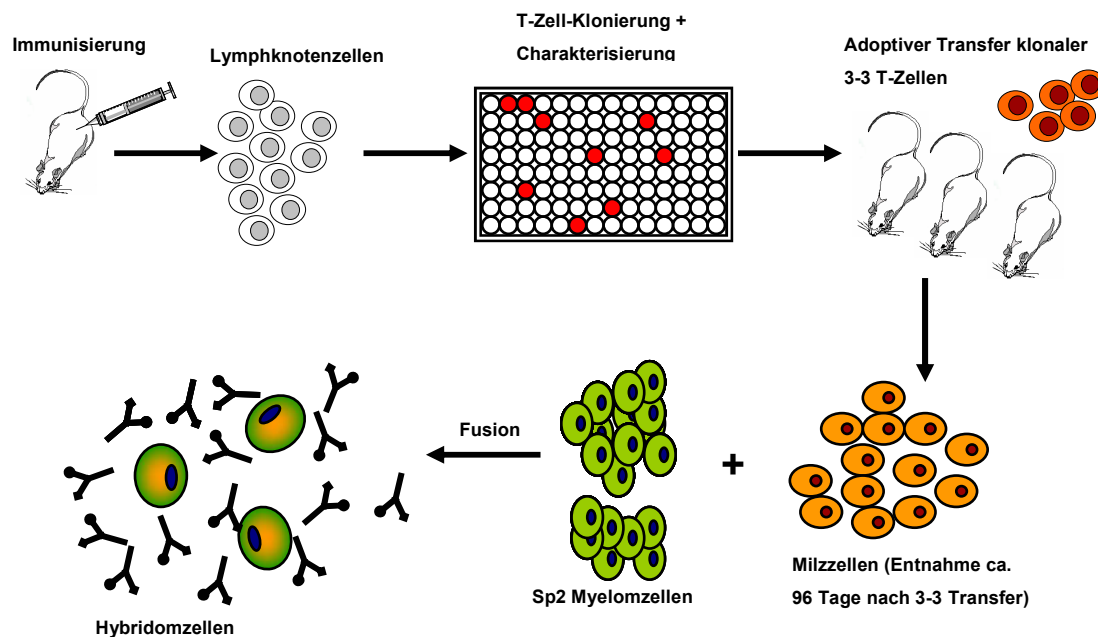


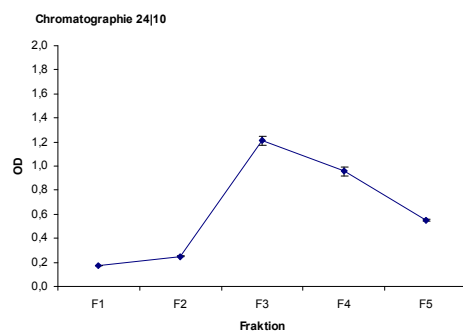
Abb. 6.: Herstellung monoklonaler Antikörper nach adoptivem Transfer klonaler 3-3 T-Zellen (PLP 139-151 spezifisch). Diese wurden nach Immunisierung von SJL-Mäusen mit dem Myelinpeptid PLP 139-151, Entnahme von Lymphknotenzellen sowie Klonierung mittels limiting-dilution Verfahren gewonnen. Im Serum der erkrankten Mäuse konnte eine hochtitrige Antikörperantwort gegen PLP 139-151 detektiert werden. 96 Tage nach T-Zelltransfer erfolgte die Entnahme von Milzzellen. Durch Fusion mit Sp2-Myelomzellen wurden antikörperproduzierende Hybridomzellen generiert. Ausgewählte Primärkulturen wurden anschließend 2 Mal kloniert, um monoklonale Antikörper zu erhalten.

Hierzu wurden SJL-Mäusen in der chronischen Phase der Erkrankung 96 Tage nach T-Zell-Transfer Milzzellen entnommen. Nach Fusion mit Sp2-Myelomzellen wurde im Zellkulturüberstand ein Screening auf PLP 139-151 spezifische Antikörper durchgeführt. Bei entsprechendem Nachweis erfolgte durch 2-malige Klonierung der Primärkulturen die Generierung monoklonaler B-Zell-Hybridome. Dominierende Isotypen der so gewonnenen monoklonalen Antikörper sind IgM, IgG1 sowie IgG2b. Ein Überblick findet sich in Tabelle 6.

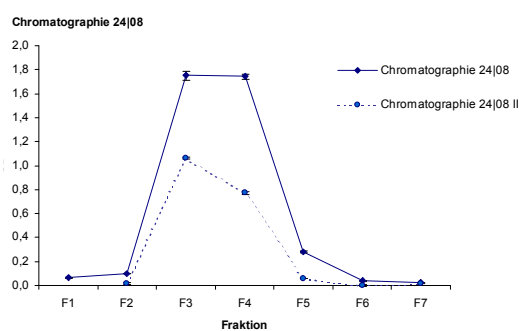
	Hybridom-Klon			Isotyp
21	21 02	21 04	21 06	IgG2b
22	22 05			IgM
24	24 08	24 10		IgG1
25	25 01	25 03	25 07	IgM
27	27 02	27 05	27 10	IgM

Tabelle 6: Auswahl von B-Zell-Hybridomen mit Sekretion PLP 139-151 spezifischer Antikörper. Orange unterlegt dargestellt sind Hybridom-Klone, aus deren Zellkulturüberständen monoklonale Antikörper durch Chromatographie angereichert bzw. aufgereinigt wurden. Alle Antikörper wurden in einem Peptid-gecoateten ELISA getestet.

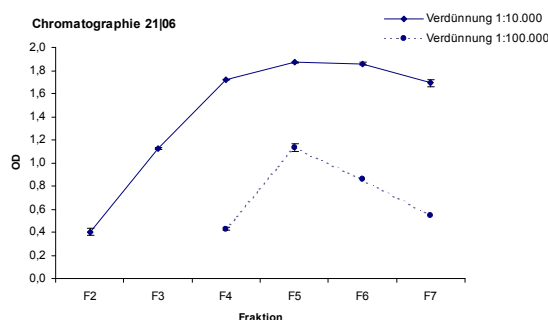
Nach Expansion der Hybridomzellen erfolgte eine weitere Anreicherung und Aufreinigung der Antikörper mittels Chromatographie. Je nach Isotyp wurden hierbei unterschiedliche Verfahren verwendet: die Aufreinigung von Antikörpern der Isotypen IgG1 sowie IgG2b erfolgte durch Protein G Affinitätschromatographie. Zur chromatographischen Aufreinigung von Immunglobulin M wurde hingegen Mercaptopyridin als Ligand eingesetzt. Die Antikörperkonzentrationen in den einzelnen Eluatfraktionen wurden mittels eines ELISAs bestimmt (Tabelle 7). Abbildung 7 stellt die Antikörperkonzentrationen in einzelnen Eluatfraktionen bei Aufreinigungen unterschiedlicher Antikörper gegenüber.



7.1



7.2



7.3

Abb. 7: Darstellung der mittels ELISA bestimmten Antikörperkonzentrationen in den einzelnen Eluatfraktionen bei einer Verdünnung von 1:10.000. Bei guter Anreicherung des IgG2b Antikörpers 21|06 erfolgte eine zusätzliche Messung bei einer Verdünnung von 1:100.000. Mittels eines gleichzeitig bestimmten Immunglobulinstandards konnte die Konzentration in den einzelnen Fraktionen ermittelt werden. **7.1:** Antikörper 24|10, Isotyp IgG1; **7.2:** Antikörper 24|08, Isotyp IgG1; **7.3:** Antikörper 21|06 Isotyp IgG2b

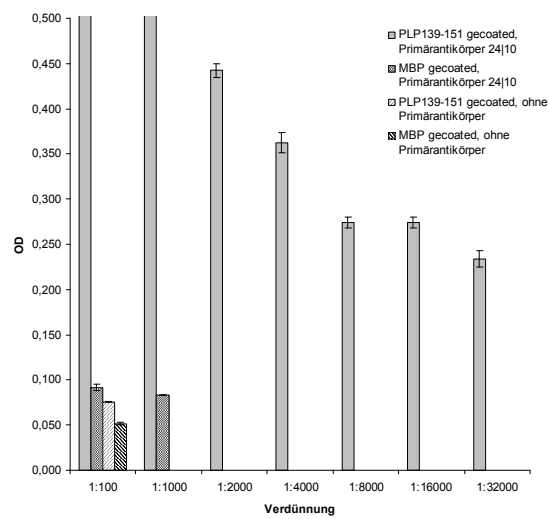
Antikörper	Isotyp	Fraktion	Konzentration [mg/ml]	V [ml]
21 06	IgG2b	2	0,86	4
		3	2,9	2
		4	7	1
		5	4,7	5
		6	3,9	5
		7	0,98	5
24 08	IgG1	3a	1	3
		4a	1	5
		5a	0,2	5
		3b	0,6	4
		4b	0,45	3
24 10	IgG1	3	0,76	4
		4	0,54	4
		5	0,18	4

Tabelle 7: Überblick Antikörperaufreinigung, Konzentrationen der einzelnen Eluatfraktionen

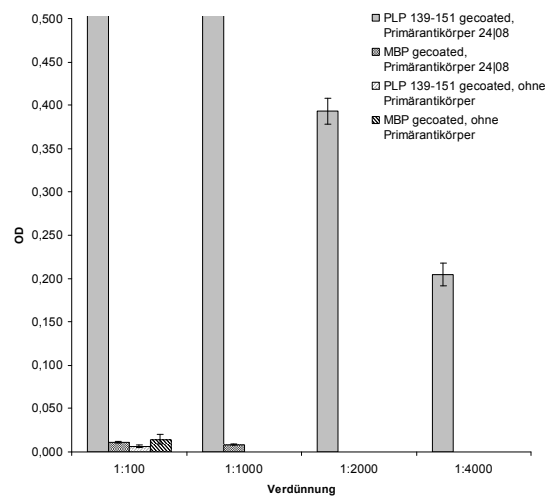
Sowohl während der Expansionsphase als auch vor bzw. unmittelbar nach der Aufreinigung wurden die Antikörper in einem PLP139-151 beschichteten ELISA getestet. Zur Abgrenzung einer unspezifischen Bindung an MBP bzw. Plastik erfolgte in der Kontrollgruppe eine Beschichtung mit bovinem MBP (Tabelle 8 bzw. Abbildung 8).

Antikörper	Beschichtung	Verdünnung	OD bzw. Extinktion
21 06	PLP 136-151	1:100	2,525 ± 0,026
		1:1000	0,733 ± 0,027
		1:2000	0,392 ± 0,017
		1:4000	0,210 ± 0,010
		1:8000	0,114 ± 0,001
		1:16000	0,057 ± 0,005
		1:32000	0,034 ± 0,002
	MBP	1:100	0,208 ± 0,010
		1:1000	0,102 ± 0,007
24 08	PLP 136-151	1:100	1,207 ± 0,069
		1:1000	0,727 ± 0,019
		1:2000	0,393 ± 0,015
		1:4000	0,205 ± 0,013
	MBP	1:100	0,011 ± 0,001
		1:1000	0,009 ± 0,0
24 10	PLP 136-151	1:100	2,574 ± 0,049
		1:1000	0,600 ± 0,006
		1:2000	0,443 ± 0,007
		1:4000	0,362 ± 0,011
		1:8000	0,274 ± 0,006
		1:16000	0,274 ± 0,006
		1:32000	0,234 ± 0,009
	MBP	1:100	0,092 ± 0,004
		1:1000	0,083 ± 0,0

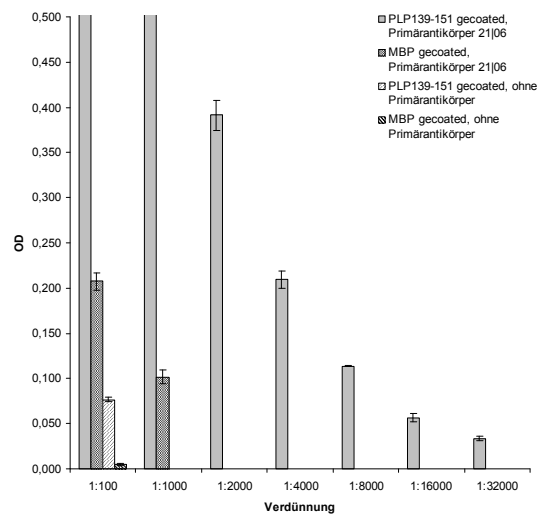
Tabelle 8.1: PLP 139-151 beschichteter bzw. MBP beschichteter ELISA



8.1



8.2



8.3

Abb. 8: Antikörper nach Aufreinigung: dargestellt sind die Ergebnisse eines ELISAs mit semiquantitativer Detektion der Antikörper. Hierzu erfolgte eine Beschichtung mit PLP139-151 bzw. bovinem MBP in den Kontrollgruppen. Die Antikörper wurden zunächst auf eine Konzentration von 0,5 mg/ml eingestellt und dann in entsprechenden Verdünnungen aufgetragen; **8.1:** 24|10; **8.2:** 24|08; **8.3:** 21|06; Auch nach der Aufreinigung binden die Antikörper an das Peptid PLP139-151; In der Kontrollgruppe mit Beschichtung mit bovinem MBP wird eine signifikant geringere Bindung detektiert. Die spezifische Bindung an PLP139-151 kann somit von unspezifischer Bindung an Plastik bzw. bovinem MBP abgegrenzt werden.

5.2 Funktionelle Charakterisierung der PLP 139-151 spezifischen Antikörper

5.2.1 Western Blot

Zur weiteren funktionellen Charakterisierung der Antikörper wurden diese in einem Western Blot an Myelinproteinen getestet. Nach Proteinextraktion aus ZNS-Gewebe von SJL-Mäusen erfolgte zunächst die selektive Darstellung von Myelin Basischem Protein (MBP; 18,5 kDa), Proteolipid Protein (PLP; 30 kDa) und Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein (MOG; 54 kDa) mittels Antikörpern bekannter Spezifität (Abb. 9.1).

Antikörper gegen PLP, MBP sowie MOG färben hierbei jeweils multiple Banden an, die durch eine Dimer- bzw. Oligomerbildung im Rahmen der Auftrennung zu Stande kommen (Arvanitis, et al. 2002). Neben dem aus 276 Aminosäuren bestehenden PLP kommt dessen Isoform DM20 zur Darstellung, die durch alternatives Splicing entsteht und 35 Aminosäuren weniger umfasst. Die monoklonalen PLP 139-151 spezifischen Antikörper 21|06, 24|08 und 24|10 zeigten hierbei weder eine spezifische Bindung an PLP noch an MOG oder MBP. Abbildung 9.2 zeigt beispielhaft die Ergebnisse für den Antikörper 24|08.

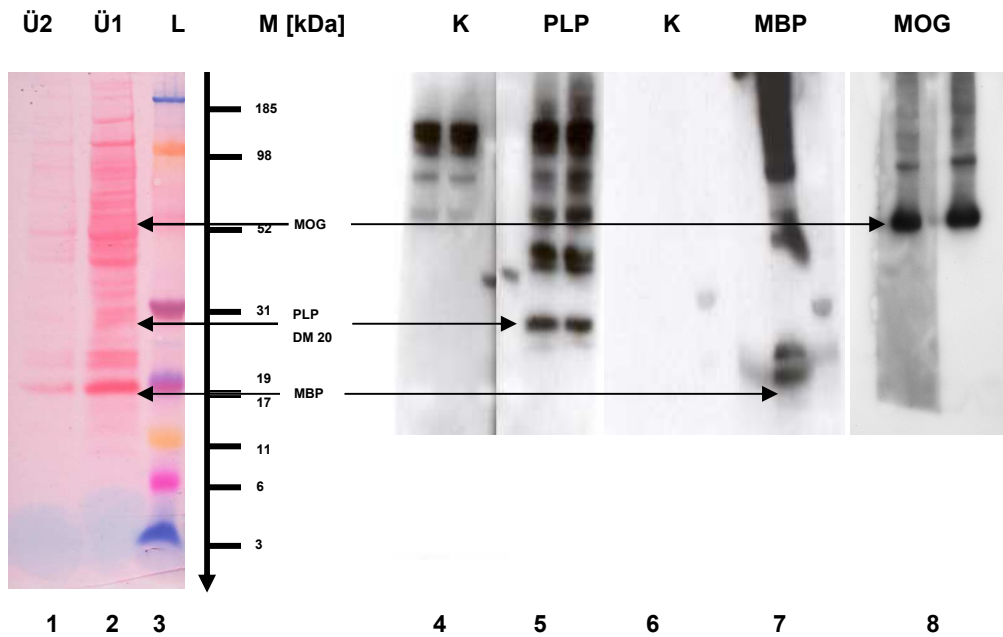


Abb. 9.1: Western Blot. 1,2,3: Ponceau S Färbung auf PVDF-Membran, 1,2: – Extraktionsfraktionen 1 und 2 des Proteinextraktes aus ZNS-Gewebe, 3: – Proteinstandardgemisch; 4,5,6,7,8: Darstellung mittels ECL; 5: Färbung mit PLP-spezifischem Primärantikörper PLPc1, PLP (30 kDa); 4: Unspezifische Färbung durch den in 5 verwendeten HRP-gekoppelten Sekundärantikörper (Spezifität: murine Immunglobuline); 7: Färbung mit MBP-spezifischem Antikörper (polyklonal, Hase), MBP (18 kDa); 6: Es zeigte sich keine unspezifische Färbung durch den in 7 verwendeten HRP-gekoppelten Sekundärantikörper (Spezifität: IgG Hase); 8: Färbung mit MOG-spezifischem Antikörper 8-18c5, MOG (54 kDa).

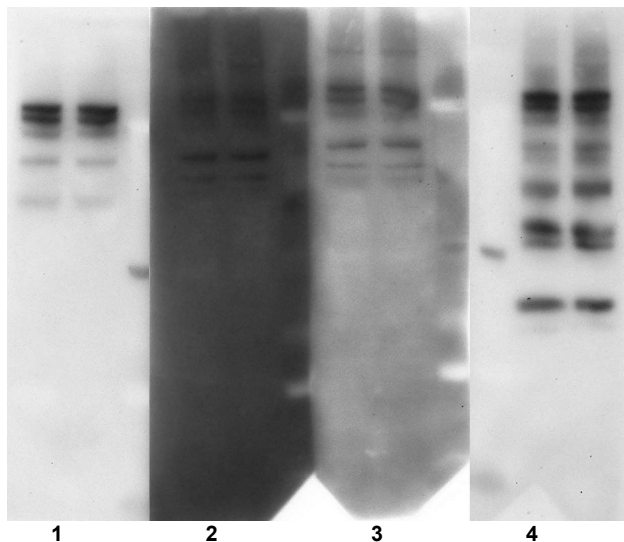


Abb. 9.2: Western Blot, 1: Unspezifische Färbung durch den in 2,3,4 verwendeten HRP-gekoppelten Sekundärantikörper (Spezifität: murine Immunglobuline); 2: Monoklonaler Antikörper 24|08 Verdünnung 1:100; 3: Antikörper 24|08 Verdünnung 1:1000; 4: Färbung mit PLP-spezifischem Primärantikörper PLPc1; es zeigt sich somit keine PLP spezifische Färbung durch 24|08.

5.2.2 Immunhistochemie

Als weiterer Aspekt der funktionalen Charakterisierung erfolgte eine Testung der monoklonalen Antikörper 21|06, 24|08 und 24|10 an Paraffin- sowie Nativ-Kryoschnitten, die durch Prof. Dr. med. C. Stadelmann-Nessler im Institut für Neuropathologie der Universitätsmedizin der Georg-August-Universität in Göttingen durchgeführt wurde. Hierbei konnte keine spezifische Färbung von Myelinbestandteilen nachgewiesen werden (Abb. 10).

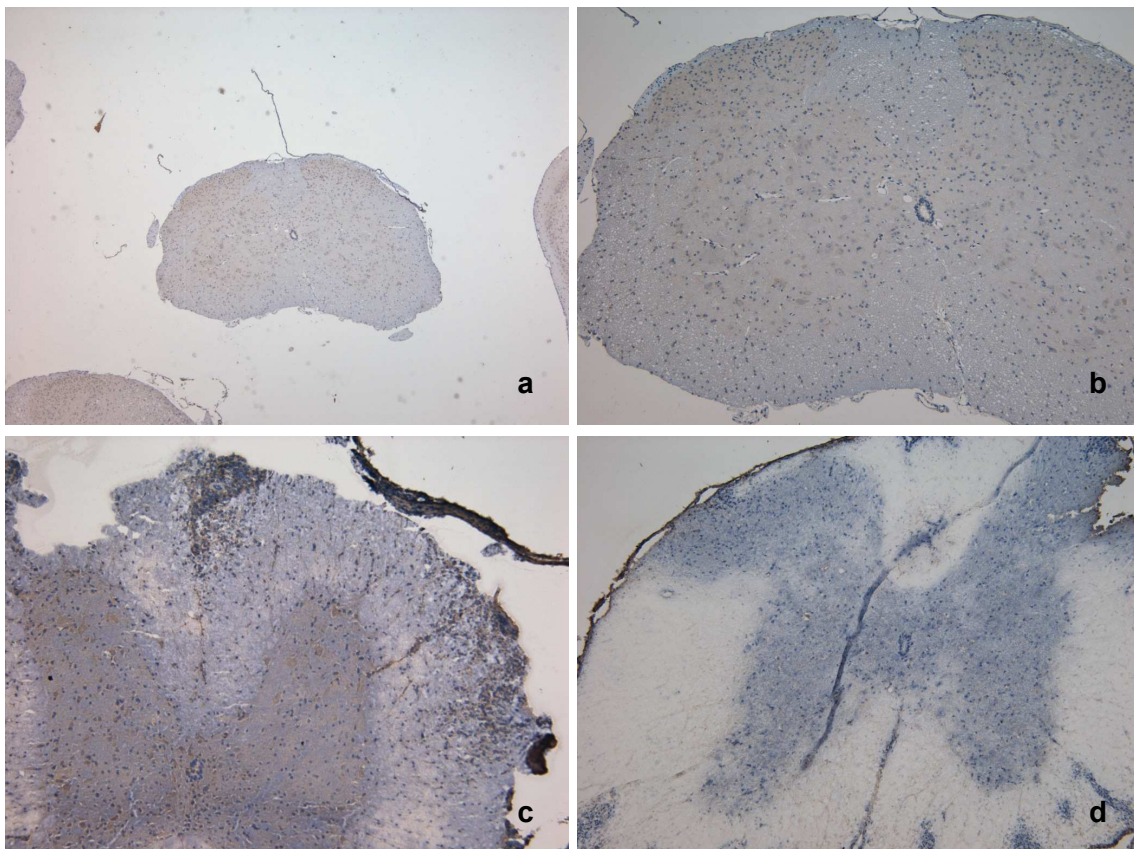


Abb. 10: **10a:** Paraffinschnitt, Vergrößerung: 40x; **10b:** Paraffinschnitt, Vergrößerung: 100x; **10c:** Nativkryoschnitt, Vergrößerung: 100x; **10d:** PFA-Kryoschnitt, Vergrößerung: 100x – es zeigt sich keine spezifische Färbung für Myelinbestandteile – exemplarische Darstellung der Ergebnisse für 21|06 (mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. med. C. Stadelmann-Nessler)

5.2.3 Transferexperimente

Zur Klärung der Frage, ob durch den alleinigen adoptiven Transfer der monoklonalen Antikörper 21|06, 24|08 und 24|10 eine EAE induziert werden kann, erfolgte eine Reihe von Transferexperimenten, bei denen die Antikörper SJL-Mäusen appliziert wurden.

5.2.3.1 Transferexperiment mit Antikörper 24|10

Abbildung 11 zeigt den Ablauf des Transferexperimentes mit Antikörper 24|10. Aufgrund der begrenzten Antikörpervorräte wurden insgesamt nur 3 SJL-Mäuse behandelt. Neben repetitiven intravenösen Gaben von 0,2 mg des Antikörpers erfolgte am Tag 0 die subkutane Gabe von komplettem Freundschem Adjuvans sowie die intraperitoneale Gabe von jeweils 100 ng Pertussis Toxin an den Tagen 1,3,6 und 9.

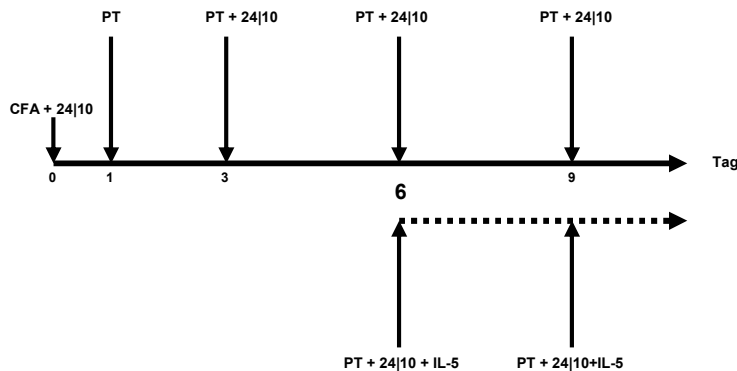


Abb. 11: Transfer von Antikörper 24|10 (Isotyp IgG1) in SJL-Mäuse (n = 3): CFA (komplettes Freundsches-Adjuvans) 50 µl s.c. an Tag 0; 24|10 jeweils 0,2 mg i.v. an den Tagen 0,3,6 und 9; PT (Pertussis Toxin) jeweils 100 ng i.p.; IL-5 jeweils 3 µg i.p.

Pertussis Toxin wird in vielen EAE-Modellen eingesetzt, um eine vermehrte Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke zu bewirken. Die Wirkung wird im Wesentlichen über Histaminrezeptoren vermittelt. Diese Effekte sind bei SJL-Mäusen besonders stark ausgeprägt (Yong, et al. 1993). An den Tagen 6 und 9 wurde eine Maus zudem mit Interleukin-5 behandelt. Dem T_H2-assoziierten IL-5 wird eine wichtige Rolle bei der Rekrutierung eosinophiler Granulozyten zugeschrieben (Sanderson 1992). Die entzündlichen Infiltrate nach adoptivem Transfer des T_H2-Klons 3-3 zeigten sich insbesondere in der frühen Erkrankungsphase durch Ablagerungen eosinophiler Granulozyten und Immunglobulinen dominiert. Daher sollte der Effekt einer zusätzlichen IL-5 Gabe im Kontext der Antikörperapplikationen geprüft werden. Von den drei behandelten Tieren verstarben die beiden nicht mit IL-5 behandelten Tiere an den Tagen 6 und 9. Bei der mit IL-5 behandelten Maus waren innerhalb des gesamten Beobachtungszeitraumes keine klinischen Zeichen einer EAE sichtbar (Tab. 9). Histopathologische Untersuchungen erbrachten keinen Hinweis auf entzündliche ZNS-Veränderungen. Die Ursachen für das frühe Versterben der Tiere konnten nicht eindeutig geklärt werden, anaphylaktoide Reaktionen nach Applikation von Antikörper bzw. Pertussis Toxin sind eine mögliche Erklärung, wobei in anderen Studien die

Applikation von bis zu 200 ng Pertussis Toxin von SJL-Mäusen problemlos toleriert worden war (Hofstetter, et al. 2002).

Maus	IL-5	Verlauf
1	-	verstorben an Tag 6
2	-	verstorben an Tag 9
3	+	<ul style="list-style-type: none"> Während des gesamten Beobachtungszeitraumes keine klinischen Zeichen einer EAE Histopathologie: keine Zeichen einer ZNS-Entzündung

Tabelle 9: Überblick Transferexperiment mit Antikörper 24|10

5.2.3.2 Transferexperiment mit Antikörper 21|06

In Abbildung 12 ist der Ablauf des Transferexperimentes mit Antikörper 21|06 dargestellt, bei dem insgesamt 8 Mäuse behandelt wurden. Analog zum Ablauf des ersten Transferexperimentes erfolgte die wiederholte intravenöse Gabe von jeweils 0,2mg des Antikörpers 21|06, an Tag 0 zudem die Gabe von komplettem Freundschens Adjuvans. An Tag 7 wurden 150 ng Pertussis Toxin intraperitoneal appliziert. Bei insgesamt 4 Mäusen erfolgte an Tag 6 bzw. 9 eine zusätzliche intraperitoneale Gabe von jeweils 3 µg IL-5.

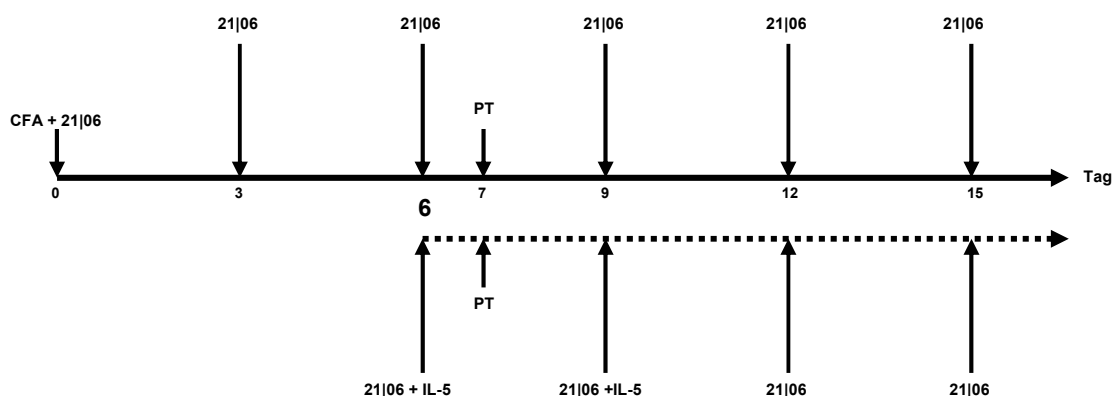


Abb. 12: Transfer von Antikörper 21|06 (Isotyp IgG 2b) in SJL-Mäuse (n = 8); CFA (komplettes Freundschens-Adjuvans) 50 µl s.c. an Tag 0; 21|06 jeweils 0,2 mg i.v. an den Tagen 0,3,6,9,12 und 15; PT 150 ng i.p.; IL-5 jeweils 3 µg i.p.

Im Rahmen des Versuches verstarben insgesamt 3 Tiere während der Behandlungsphase. Bei den übrigen Tieren konnten während des gesamten Beobachtungszeitraumes keine klinischen Zeichen einer EAE nachgewiesen werden.

Histopathologische Untersuchungen erbrachten ebenfalls keinen Hinweis auf entzündliche Veränderungen des ZNS (Tab.10).

Maus	IL-5	Verlauf
1	-	verstorben an Tag 10
2	-	verstorben an Tag 12
3	-	<ul style="list-style-type: none"> Während des gesamten Beobachtungszeitraumes keine klinischen Zeichen einer EAE Histopathologie: keine Zeichen einer ZNS-Inflammation
4	-	
5	+	verstorben an Tag 9
6	+	<ul style="list-style-type: none"> Während des gesamten Beobachtungszeitraumes keine klinischen Zeichen einer EAE Histopathologie: keine Zeichen einer ZNS-Inflammation
7	+	
8	+	

Tabelle 10: Überblick Transferexperiment mit Antikörper 21|06

In beiden Transferexperimenten verstarb ein erheblicher Anteil der Tiere bereits während der Behandlungsphase. Bei den übrigen Tieren konnten während des gesamten Beobachtungszeitraumes von 30 Tagen keine klinischen Zeichen einer EAE festgestellt werden. Passend hierzu fanden sich in den histopathologischen Untersuchungen ebenfalls keine Hinweise auf eine ZNS-Inflammation. Somit konnte in der vorliegenden Versuchsanordnung nach intravenöser Applikation monoklonaler PLP 139-151 spezifischer Antikörper keine EAE induziert werden.

5.3 Antikörperantwort gegen weitere Myelinpeptide

Die zunächst ausgewählten und getesteten PLP 139-151 spezifischen Antikörper 21|06, 24|08 und 24|10 zeigten weder in einem Western-Blot mit Myelinproteinen noch an Kryo- oder Paraffinschnitten von ZNS-Gewebe eine spezifische Bindung an PLP. Durch adoptiven Transfer in SJL-Mäuse konnte trotz Vorbehandlung mit Pertussis Toxin keine EAE induziert werden.

In einem nächsten Schritt wurde daher eine andere Herangehensweise gewählt: Wurde zunächst nach Generierung der Hybridomzellen in den Überständen der Primärkulturen wie unter 3.2.1.5 beschrieben, lediglich ein ELISA-Screening auf PLP 139-151 spezifische Antikörper durchgeführt, wurde das Screening nun um folgende Myelinpeptide bzw. Proteine erweitert: MBP 83-105, bovines MBP sowie MOG 35-55 (Tab. 11). Vorangegangene Arbeiten hatten zudem gezeigt, dass sich nach adoptivem Transfer des PLP 139-151 spezifischen T-Zell-Klons 3-3 bereits in der Frühphase der

Erkrankung in vivo neben einer hochtitrigen PLP 139-151-spezifischen Antikörperantwort auch Antikörper gegen MOG 1-125 sowie MBP finden. Die Antikörpertiter fielen in der chronischen Phase der Erkrankung ab (Nessler 2005).

Primärkultur	Peptid- bzw. Protein-gecoateter ELISA				WB	Immunhistochemie	
	PLP139-151	MBP ges.	MBP 83-105	MOG 35-55		P	K
1B1	-	+	-	-	-	-	-
4D4	+	-	-	-	-	n.d.	n.d.
1E11	-	+	-	+	-	-	-
2E3	+	-	-	-	-	n.d.	n.d.
4E6	+	-	-	+	-	+	-
2E7	-	-	-	-	-	n.d.	n.d.

Tabelle 11: Übersicht - Screening der polyklonalen Primärkulturen; WB (Western Blot) mit Myelinproteinen (MOG, PLP, MBP); P (Paraffin Schnitte); K (Kryoschnitte – nativ und PFA-fixiert); n.d. – nicht bestimmt, + positives Ergebnis, - negatives Ergebnis;

Im Rahmen des Screenings konnte die Primärkultur 4E6 identifiziert werden, in deren Zellkulturüberstand sich im ELISA neben Antikörpern gegen PLP 139-151 auch solche gegen MOG 35-55 fanden. Im Western Blot konnte keine spezifische Bindung an Myelinproteine nachgewiesen werden. Im Rahmen der immunhistochemischen Untersuchungen färbten Kulturüberstände von 4E6 Myelin in Paraffinschnitten. In Nativ- oder PFA-Kryoschnitten zeigte sich hingegen keine spezifische Färbung. Im Folgenden wurde, wie unter 3.2.1.5 beschrieben, eine Klonierung der Primärkultur 4E6 durchgeführt. Es wurden insgesamt 24 Klone generiert, bei denen Antikörper aus den jeweiligen Zellkulturüberständen Myelin an Paraffinschnitten spezifisch färbten. Nach chromatographischer Aufreinigung erfolgte eine weitere funktionelle Charakterisierung analog 4.2.

5.3.1 4E6-2 – ein monoklonaler MOG 35-55 spezifischer IgM-Antikörper

Unter den aus 4E6 generierten Klonen wurde der Hybridom-Klon 4E6-2 zur weiteren Charakterisierung ausgewählt. Im peptid-gecoateten ELISA zeigten die von 4E6-2 produzierten Antikörper eine Reaktivität gegenüber MOG 35-55, nicht jedoch gegenüber PLP 139-151, MBP gesamt bzw. MBP 83-105. Der mittels ELISA bestimmte Isotyp von 4E6-2 ist IgM.

Analog zu 4.1 erfolgte eine weitere chromatographische Aufreinigung (Abb. 13). Die Antikörperkonzentrationen in den einzelnen Fraktionen wurde mittels ELISA bestimmt (Tab. 12). Zudem erfolgte eine Testung mittels eines MOG-beschichteten ELISAs. Zur

Abgrenzung einer unspezifischen Bindung an MBP bzw. Plastik erfolgte in der Kontrollgruppe eine Beschichtung mit bovinem MBP (Abbildung 14 bzw. Tabelle 13).

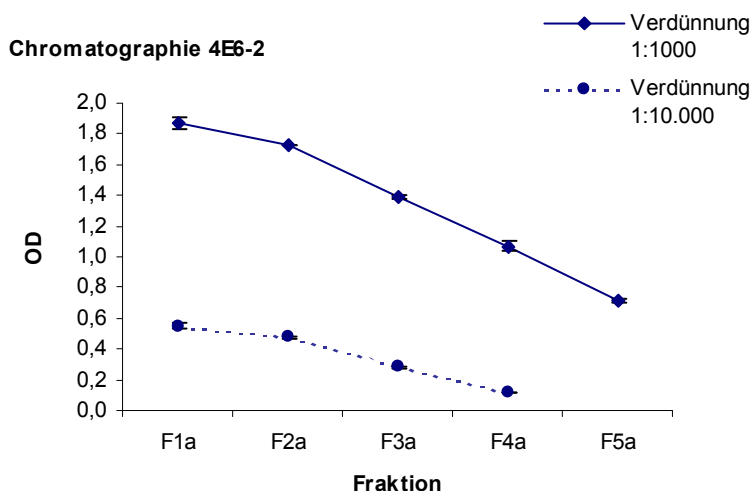


Abb. 13: Chromatographische Aufreinigung des Antikörpers 4E6-2, Isotyp IgM. Darstellung der mittels ELISA bestimmten Antikörperkonzentrationen in den einzelnen Eluatfraktionen bei einer Verdünnung von 1:1000 bzw. 1:10.000. Im Gegensatz zur chromatographischen Aufreinigung von Antikörpern der Isotypen IgG1 bzw. IgG2b mittels Protein G Affinitätschromatographie zeigte sich hier ein abweichendes Anreicherungs- bzw. Elutionsverhalten – bereits in den ersten Eluatfraktionen fand sich eine maximale Anreicherung. Analoge Ergebnisse fanden sich bei weiteren chromatographischen Aufreinigungen von 4E6-2 (b,c)

Antikörper	Isotyp	Fraktion	Konzentration [mg/ml]	V [ml]
4E6-2	IgM	1a	0,7	1
		2a	0,6	
		3a	0,3	
		4a	0,1	
		5a	0,09	
		1b	0,9	
		2b	0,96	
		3b	0,53	
		4b	0,27	
		5b	0,16	
		1c	0,84	
		2c	0,86	
		3c	0,4	
		4c	0,2	
		5c	0,14	

Tabelle 12: Chromatographische Aufreinigung des monoklonalen Antikörpers 4E6-2, Isotyp IgM – insgesamt wurden 3 Aufreinigungen a,b,c durchgeführt.

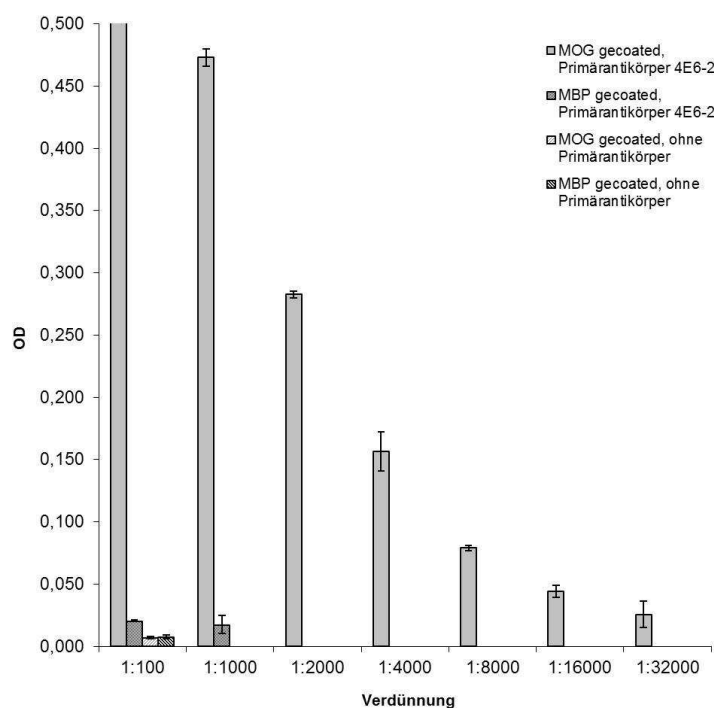


Abb. 14: Antikörper nach Aufreinigung: dargestellt sind die Ergebnisse eines ELISAs mit semiquantitativer Detektion des Antikörpers. Zunächst erfolgte eine Beschichtung mit MOG bzw. bovinem MBP in den Kontrollgruppen. Der Antikörper wurde zunächst auf eine Konzentration von 0,5 mg/ml eingestellt und dann in entsprechenden Verdünnungen aufgetragen; In der Kontrollgruppe mit Beschichtung mit bovinem MBP erfolgt eine signifikant geringere Bindung. Die spezifische Bindung an MOG kann somit von unspezifischer Bindung an Plastik bzw. bovinem MBP abgegrenzt werden.

Antikörper	Beschichtung	Verdünnung	OD bzw. Extinktion
4E6-2	MOG	1:100	2,005 ± 0,014
		1:1000	0,473 ± 0,007
		1:2000	0,283 ± 0,003
		1:4000	0,157 ± 0,016
		1:8000	0,079 ± 0,002
		1:16000	0,044 ± 0,005
		1:32000	0,026 ± 0,011
	MBP	1:100	0,021 ± 0,0
		1:1000	0,018 ± 0,008

Tabelle 13: MOG beschichteter bzw. MBP beschichteter ELISA

5.3.2 Western Blot

Zur weiteren funktionellen Charakterisierung erfolgte eine Testung des aufgereinigten Antikörpers 4E6-2 mittels Western Blot an Myelinproteinen. Es zeigte sich eine schwache, jedoch reproduzierbare Bindung gegenüber MOG (Abb. 13).

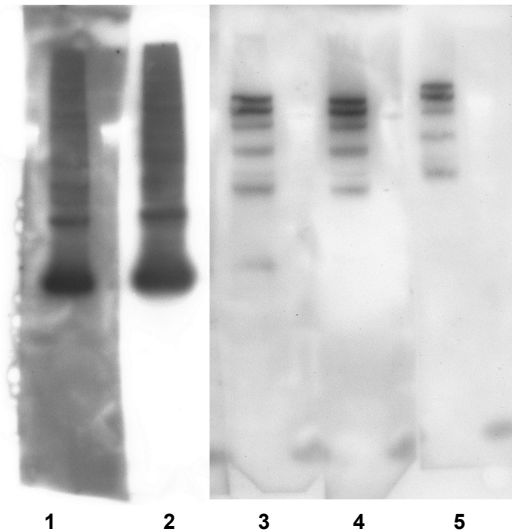


Abb. 15: Testung von 4E6-2 im Western Blot an Myelinprotein: 1+2: Primärantikörper Anti-MOG 8-18c5; 1: Verdünnung 1:1000; 2: Verdünnung 1:2000; 3+4: Primärantikörper 4E6-2; 3: Verdünnung 1:250; 4: Verdünnung 1:500; 5: Unspezifische Färbung durch den in 1+2+3+4 verwendeten HRP-gekoppelten Sekundärantikörper (Spezifität: murine Immunglobuline)

5.3.3 Immunhistochemie

Bereits vor der chromatographischen Aufreinigung war 4E6-2 sowohl an Paraffin- als auch an Kryoschnitten getestet worden. Hierbei färbte 4E6-2 Myelin an Schnitten aus Paraffineinbettung ohne Mikrowellenvorbehandlung. Bei Nativ- und PFA-Kryoschnitten hingegen zeigte sich keine spezifische Färbung (Abb. 14).

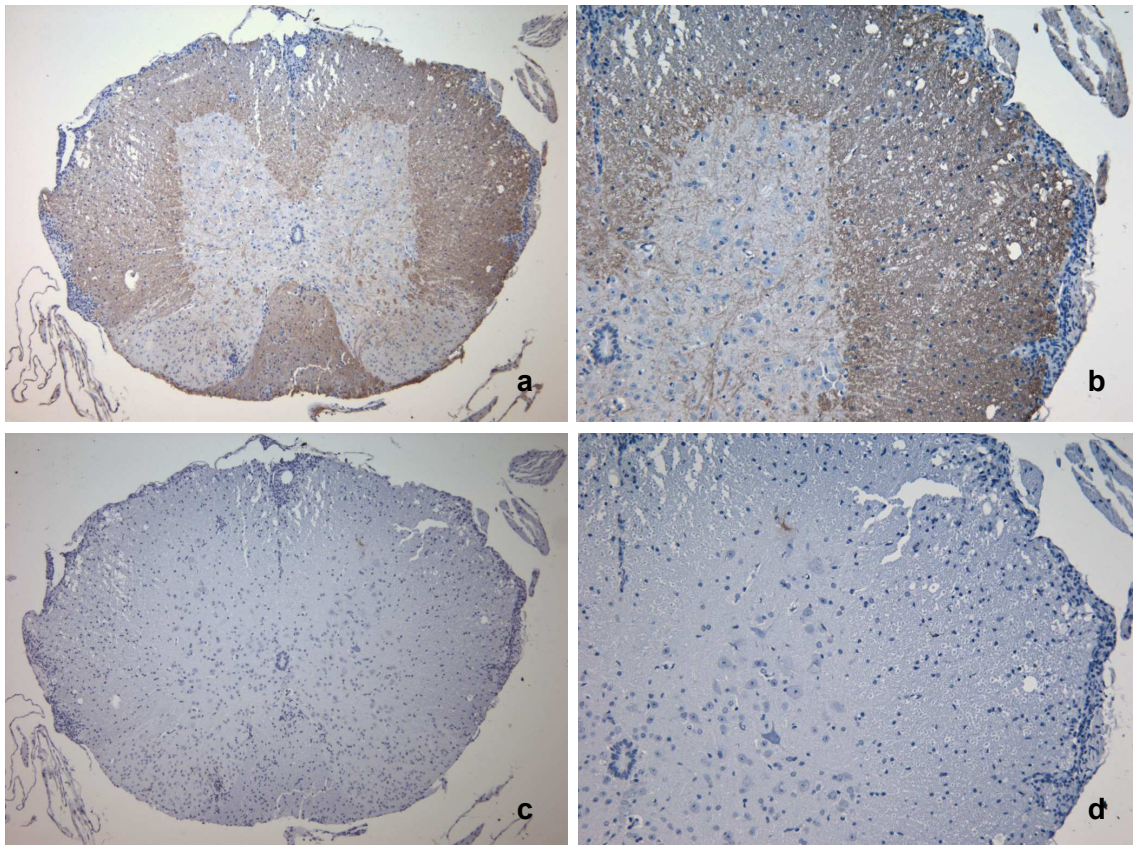


Abb. 16: **16a:** 4E6-2 an Paraffin, ohne Mikrowellenvorbehandlung, Vergrößerung: 100x; **16b:** 4E6-2 Paraffin, ohne Mikrowellenvorbehandlung, Vergrößerung: 200x; **16c:** Paraffin, Negativkontrolle 100x; **16d:** Paraffin, Negativkontrolle 200x; 4E6-2 färbt Myelin an Schnitten aus Paraffineinbettung ohne Mikrowellenvorbehandlung; an Nativ- und PFA-Kryoschnitten zeigte sich keine spezifische Färbung (mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. med. C. Stadelmann-Nessler)

5.3.4 Klinischer Verlauf nach adoptivem Co-Transfer mit 4E6-2

Zur weiteren funktionellen Charakterisierung des monoklonalen MOG 35-55 spezifischen Antikörpers 4E6-2 wurde ein Experiment mit adoptivem T-Zell bzw. Antikörpertransfer durchgeführt. Hiermit sollte bei schon an EAE erkrankten Mäusen die Auswirkung der Applikation von 4E6-2 auf den weiteren Verlauf der Erkrankung untersucht werden.

Die EAE-Induktion erfolgte durch adoptiven Transfer von jeweils 10 Millionen Zellen des zuvor etablierten PLP 139-151 spezifischen T_H1 -Klons cPLP-25 (Nessler 2005). Diese wurden zuvor über 3 Tage mit antigenpräsentierenden Zellen sowie PLP 139-151 stimuliert und im Anschluss durch intraperitoneale Injektion transferiert. 18 Tage nach T-Zell-Transfer wurde ein adoptiver Transfer von jeweils 100 μ g 4E6-2 durchgeführt. In der Kontrollgruppe wurde ein MOPS-spezifischer Antikörper verwendet, von dem jeweils 250 μ g transferiert wurden. Die Antikörper wurden durch intraperitoneale Injektion appliziert (Abb. 15).

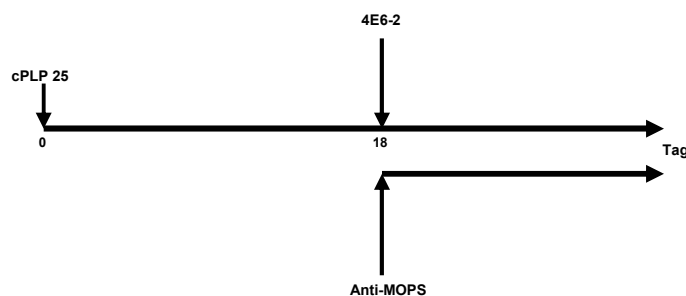


Abb. 17: Transferexperiment: Tag 0 Transfer (i.p.) von jeweils 10 Millionen PLP 139-151 spezifischer T-Zellen des T_H1 -Klons cPLP-25 in SJL-Mäuse ($n = 4$); Tag 18 adoptiver Transfer (i.p.) von 100 μ g 4E6-2 ($n = 2$) bzw. 250 μ g des Kontrollantikörpers (Anti MOPS) ($n = 2$), Beobachtung bis Tag 30, dann Beendigung des Versuchs, Perfusion der Tiere sowie histopathologische Auswertung

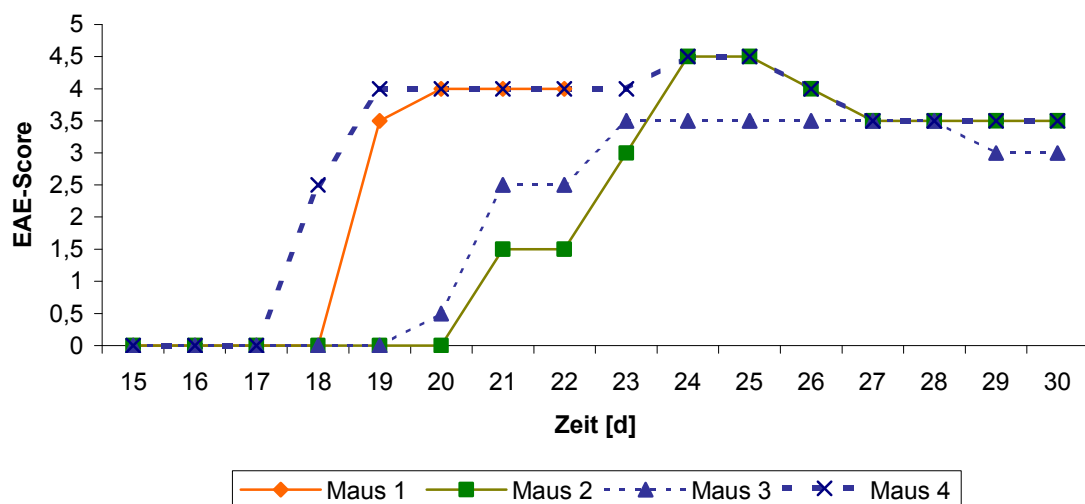


Abb. 18: Transferexperiment: EAE-Score im Verlauf, Zeit: Tage nach T-Zell-Transfer; Antikörpertransfer an Tag 18; Mäuse 1 + 2: jeweils 100 μ g des Antikörpers 4E6-2; Mäuse 3+4: jeweils 100 μ g des Kontrollantikörpers

Um Tag 18 nach T-Zell-Transfer waren erste EAE-typische Symptome zu beobachten. In Abbildung 16 ist der jeweilige EAE-Score für die Versuchstiere dargestellt. Zwischen den Versuchsgruppen lässt sich kein signifikanter Unterschied beobachten. Eine der mit 4E6-2 behandelten Mäuse verstarb vorzeitig an Tag 22. Die Tiere wurden über 30 Tage beobachtet. Zur weiteren Charakterisierung wurden histopathologische Untersuchungen durchgeführt. Hierbei zeigen sich bei allen Versuchstieren flächige Entmarkungsherde. In der quantitativen Auswertung fanden sich keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Läsionsgröße.

In einem zweiten Transferversuch erfolgte nach analoger Vorbehandlung mit adoptivem Transfer von 10 Millionen zuvor stimulierter Zellen des T_H1-Klons cPLP25 nun eine repetitive Antikörperapplikation 11 bzw. 14 Tage nach Manifestation der ersten EAE-Symptome um Tag 18 nach T-Zell-Transfer. Die Beobachtung erstreckte sich bis zum Tag 36, an dem die Tiere nach Perfusion einer histopathologischen Untersuchung des ZNS zugeführt wurden (Abb. 17). Für den adoptiven Transfer des MOG 35-55 spezifischen monoklonalen Antikörpers 4E6-2 im Vergleich zu dem myelinunspezifischen Kontrollantikörper Anti-MOPS konnte in den durchgeführten Transferexperimenten keine krankheitsmodifizierende Wirkung nachgewiesen werden. Auch die histopathologische Auswertung erbrachte im Hinblick auf die Läsionsgrößen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen (Tab. 12; Abb. 18). In der semiquantitativen Auswertung fanden sich jedoch in der mit dem Kontrollantikörper Anti-MOPS behandelten Gruppe geringere Ablagerungen von Immunglobulinen (Tab. 13).

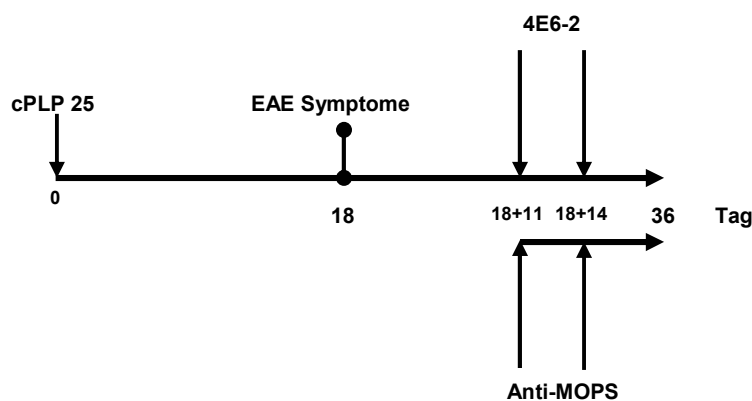


Abb. 19: Transferexperiment: Tag 0 Transfer (i.p.) von jeweils 10 Millionen PLP 139-151 spezifischer T-Zellen des T_H1-Klons cPLP-25 in SJL-Mäuse (n = 6); um Tag 18: erste EAE Symptome; an den Tagen 18+11 und 18+14 adoptiver Transfer (i.p.) von jeweils 100 µg 4E6-2 (n = 4) bzw. 250 µg des Kontrollantikörpers (Anti MOPS) (n = 2), Beobachtung bis Tag 36, dann Beendigung des Versuchs, Perfusion der Tiere sowie histopathologische Auswertung

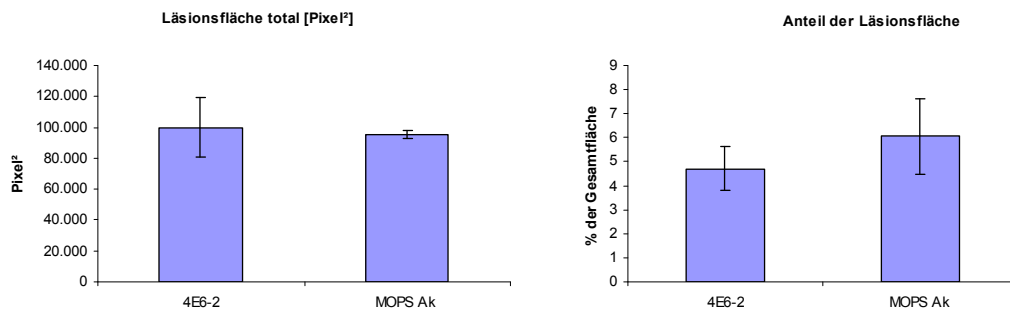


Abb. 20: Darstellung der Mittelwerte der Läsionsflächen bzw. der Mittelwerte der Anteile an den insgesamt ausgewerteten Flächen für die beiden Versuchsgruppen (mit Standardabweichungen).

	4E6-2 ± SD (n = 4)	Anti-MOPS ± SD (n = 2)	p
Läsionsfläche total [Pixel²]	99824 ± 38644	95466 ± 3800	0,88
Anteil Läsionsfläche [%]	4,7 ± 1,8	6,1 ± 2,2	0,4

Tabelle 14: Quantitativer Vergleich der Läsionsflächen in den beiden Versuchsgruppen: Es erfolgte eine geblindete quantitative Auswertung von jeweils 10 systematisch angefertigten Übersichtsaufnahmen je Versuchstier. Für jedes Tier wurde aus den 10 Übersichtsaufnahmen zum einen die gesamte Läsionsfläche zum anderen deren Anteil an der gesamten ausgewerteten Fläche bestimmt. Insgesamt wurden 4 Tiere mit jeweils 2x 100 µg des monoklonalen Antikörpers 4E6-2 sowie jeweils 2 Tiere mit 250 µg des monoklonalen Kontrollantikörpers Anti-MOPS behandelt. Dargestellt sind zum einen der Mittelwert der detektierten Läsionsflächen [Pixel²] sowie der Mittelwert der Läsionsanteile an der insgesamt ausgewerteten Fläche [%] je Versuchsgruppe. Zwischen den Versuchsgruppen fand sich kein signifikanter Unterschied (p-Werte 0,88 bzw. 0,4, ungepaarter t-Test) (mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. med. C. Stadelmann-Nessler).

Maus Nr.	Behandlung	EAE Score	HE/LFB-Färbung	IgG	MRP14	IgM
1	4E6-2 i.p.	2,5	Kleine flächige Läsionen	-	-	+/- Plasmazellen
2	4E6-2 i.p.	2,5	Flächige Läsionen	++	Einige Läsionen +, andere -	+
3	4E6-2 i.p.	3,5	Eher akut entzündlich als flächig	+	Einige Läsionen +, andere -	+
4	Anti-MOPS i.p.	3	Flächig (wie Nr.1)	-	-	+/- Plasmazellen
5	4E6-2 i.p.	3,5	Riesige flächige Läsionen	+	Größtenteils -, wenige +	Plasmazellen; Läsion: körnig
7	Anti-MOPS i.p.	3,5	Kleine flächige Läsionen	+/-	+/-	-

Tabelle 15: Histopathologische Auswertung des zuvor beschriebenen Transferexperimentes: Tag 0: adoptiver Transfer von 10^7 T-Zellen des T_H1 -Klons cPLP25; Tag 18+11 bzw. 18+14 adoptiver Transfer (i.p.) von jeweils 100 µg 4E6-2 (n = 4) bzw. 250 µg des Kontrollantikörpers (Anti MOPS) (n = 2), Beobachtung bis Tag 36, dann Beendigung des Versuchs, Perfusion der Tiere sowie histopathologische Auswertung; Score: EAE Score an Tag 36, HE/LFB-Färbung semiquantitative Auswertung, IgG bzw. IgM semiquantitative Auswertung, MRP14: Marker früher Makrophagenaktivierung (Differenzierung frischer Läsion versus Relapse); Zusammenfassung: Es gibt flächige Entmarkungsherde mit und ohne IgM und IgG-Ablagerung; keine signifikanten Unterschiede bzgl. der Läsionsgröße in den beiden Behandlungsgruppen; tendenziell weniger Immunglobulinablagerungen bzw. MRP 14 positive Zellen in den mit Anti-MOPS behandelten Tieren (mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. med. C. Stadelmann-Nessler)

6 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit ist eine Charakterisierung der Antikörperantwort gegen das Myelinpeptid PLP 139-151 sowie weitere Myelinbestandteile in einem neuen EAE T_H2 -Transfermodell bei immunkompetenten SJL-Mäusen.

Durch adoptiven Transfer zuvor aktivierter Zellen des PLP 139-151 spezifischen T_H2 -Klons 3-3 kann eine EAE mit chronischem Verlauf induziert werden. Die entzündlichen Läsionen sind bereits in der Frühphase der Erkrankung durch Infiltrate mit eosinophilen Granulozyten sowie Immunglobulinablagerungen charakterisiert. In der chronischen Phase fallen Ablagerungen von B-Zellen, Immunglobulinen, Plasmazellen sowie Makrophagen bei ausgeprägter Plaquebildung auf. Im Serum der Mäuse kann eine hochtitrige Antikörperantwort gegen PLP 139-151 sowie weitere Myelinbestandteile nachgewiesen werden. Die dominierenden Isotypen in der chronischen Phase sind IgM und IgG1 (Nessler 2005). Der Nachweis von IgM in der chronischen Phase der Erkrankung deutet auf eine anhaltende B-Zell-Stimulation im Krankheitsverlauf hin, da ohne repetitive T-Zell-abhängige Stimulation ein rascher Isotypklassenwechsel von IgM auf IgG stattfindet (Jacob, et al. 1991; Stavnezer 1996). Durch Parallelen zum histopathologischen Typ II der Multiplen Sklerose (Lucchinetti, et al. 2000) sowie zum B-Zell-dominierten Liquorphänotyp der Multiplen Sklerose (Cepok, et al. 2001) kann das hier verwendete Modell zum Verständnis humoraler Effektormechanismen, die bei Subtypen der Multiplen Sklerose eine wichtige Rolle zu spielen scheinen, beitragen.

Die Beobachtungen aus dem hier verwendeten neuartigen Modell mit EAE-Induktion durch adoptiven Transfer PLP 139-151 spezifischer T_H2 -Zellen in immunkompetente SJL-Mäuse legen den Schluss nahe, dass der T_H2 -Klon 3-3 rasch und effizient eine myelinspezifische Antikörperantwort induzieren kann. Neben Antikörpern, die gegen das lineare Epitop PLP 139-151 gerichtet sind, finden sich bereits in der Frühphase der Erkrankung auch solche gegen MBP oder MOG 35-55. Dies deutet darauf hin, dass es schon in den ersten Tagen nach T-Zell-Transfer zur Freisetzung von Myelinbestandteilen zu kommen scheint, die nach Präsentation durch antigenpräsentierende Zellen in den lokoregionären Lymphknoten eine entsprechende zelluläre und humorale Immunantwort stimulieren können. Somit findet eine rasche Ausdehnung der humoralen Immunantwort statt, die neben PLP nun gegen weitere Myelinbestandteile gerichtet ist (Nessler 2005).

Nach Entnahme von Milzzellen in der chronischen Phase der EAE ca. 90 Tage nach T_H2 -Zelltransfer wurden durch Fusion mit Zellen der Sp2-Maus-Myelomzelllinie antikörperproduzierende Hybridomzellen generiert. *Auf diese Weise konnten monoklonale Antikörper generiert werden, die nicht durch eine vorherige aktive Immunisierung mit den jeweiligen Antigenen, sondern nach adoptivem Transfer PLP 139-151 spezifischer T_H2 -Zellen entstanden sind.* Entsprechend der Situation in vivo werden neben Hybridomzellen, die PLP 139-151 spezifische Antikörper produzieren, auch solche generiert, die Antikörper gegen weitere Myelinpeptide, wie z.B. MOG 35-55 produzieren. Die so gewonnenen monoklonalen Antikörper ermöglichen eine funktionale Charakterisierung der nach adoptivem Transfer des T_H2 -Klons 3-3 stattfindenden Antikörperantwort.

Im ersten Teil der Arbeit wurden ausgewählte Antikörper gegen PLP 139-151 aufgereinigt und in ELISA, Western-Blot, an Gewebsschnitten sowie im Rahmen von Transferexperimenten getestet: Die Antikörper 24|08 und 24|10 mit dem Isotyp IgG1 sowie der Antikörper 21|06 mit dem Isotyp IgG2b banden in einem peptid-gecoateten ELISA an PLP 139-151. Weder in einem Western Blot mit Myelinproteinen noch an Kryo- oder Paraffinschnitten von ZNS-Gewebe zeigte sich hingegen eine spezifische Bindung an PLP bzw. Myelin. Diese Beobachtungen stehen im Gegensatz zu einer Arbeit von Laman et al., bei der ein Panel von PLP139-151 spezifischen, monoklonalen Antikörpern, die in einem SJL-EAE-Modell generiert wurden, an Gewebsschnitten von sowohl intaktem Myelin als auch demyelinisierenden Läsionen getestet wurden. Hierbei zeigte sich, dass die Antikörper mit Myelin unterschiedlicher Spezies reagierten (Laman, et al. 2001). Der wesentliche Unterschied zwischen der Studie von Laman und der vorliegenden Arbeit besteht einerseits in der Tatsache, dass ein Protokoll mit aktiver PLP-Peptid-Immunisierung verwendet wurde, während hier eine Antikörperantwort nach Transfer myelinspezifischer T_H2 -Zellen induziert wurde, wobei es sich beim T_H2 -Transfer um den vermeintlich physiologischeren Ansatz handelt. Durch die Freisetzung entsprechender Antigene im Rahmen der Demyelinisierung unter gleichzeitiger Co-Stimulation durch myelinspezifische T-Zellen kommt es zu einer effizienten Induktion einer Antikörperantwort. Da Antikörper klassischerweise Konformationsepitope erkennen, kann nicht zwangsläufig davon ausgegangen werden, dass Antikörper, die für das PLP-Peptid 139-151 spezifisch sind, mit intaktem Myelin interagieren und das Peptid in seiner dort vorhandenen „Konformation“ bzw. als Teil des Gesamtproteins erkennen. Diese Überlegung zeigt die Limitationen des in der vorliegenden Arbeit verwendeten Modells, gerade im Hinblick auf die Funktion der

Antikörper in den Transferversuchen. Der adoptive Transfer der PLP139-151 spezifischen Antikörper in mit Pertussis Toxin vorbehandelte syngene Tiere konnte *keine* klinischen EAE-Symptome induzieren. In der histopathologischen Untersuchung der behandelten Tiere fanden sich *keine* Zeichen einer ZNS-Inflammation.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden Antikörper gegen weitere Myelinpeptide untersucht. Hierbei konnte die Primärkultur 4E6 identifiziert werden, in deren Zellkulturüberstand neben Antikörpern gegen PLP 139-151 auch solche gegen MOG 35-55 nachgewiesen werden konnten. Bei Testung des Zellkulturüberstandes von 4E6 an Paraffinschnitten zeigte sich eine spezifische Färbung von Myelin. Nach Klonierung der Primärkultur konnte eine Reihe von Hybridomklonen etabliert werden, die im ELISA an MOG 35-55 binden und Myelin an Paraffinschnitten spezifisch färben. Der Klon 4E6-2 mit dem Isotyp IgM wurde für weitere Untersuchungen chromatographisch aufgereinigt. Im Western Blot zeigte sich eine schwache, jedoch reproduzierbare Bindung an MOG. In Transferexperimenten wurde der Antikörper zu unterschiedlichen Zeitpunkten syngeneten Tieren appliziert, bei denen zuvor durch Transfer des T_H1-Klons cPLP-25 eine EAE induziert worden war. Erste EAE-Symptome wurden um Tag 18 nach T-Zell-Transfer beobachtet. Der den klinischen Verlauf wieder spiegelnde EAE-Score zeigte zwischen den mit 4E6-2 behandelten Tieren und der Kontrollgruppe keinen Unterschied. Auch die im Anschluss durchgeführten histopathologischen Untersuchungen ergaben im Hinblick auf die Läsionsgrößen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen. Eine *krankheitsmodifizierende Wirkung* der getesteten monoklonalen Antikörper nach adoptivem Transfer konnte somit *nicht* beobachtet werden. Die Ergebnisse im vorliegenden Modell stehen somit im Gegensatz zu anderen Studien mit MOG-spezifischen Antikörpern, die in adoptiven Transfermodellen mit unterschiedlichen Spezies eine verstärkte Demyelinisierung induzieren konnten (Schluesener, et al. 1987; Linington, et al. 1988). Eine wesentliche Ursache für das unterschiedliche pathogenetische Potential liegt nicht nur in der unterschiedlichen Spezifität der Antikörper, sondern auch in deren Effektorfunktionen wie z.B. der Fähigkeit zur Komplementaktivierung (Piddlesden, et al. 1993). In einer Arbeit von Kerlero de Rosbo konnte das demyelinisierende Potential des Antikörpers 8-18C5 auch in Zellkulturen nachgewiesen werden. Eine fehlende Wirkung in Abwesenheit von Komplementfaktoren unterstreicht hierbei auch in vitro die Bedeutung der komplementvermittelten Effektormechanismen (Kerlero de Rosbo, et al. 1990). Außer für den MOG-spezifischen Antikörper 8-18C5 konnte eine

krankheitsverstärkende Wirkung auch für MBP-spezifische polyklonale Antikörper nachgewiesen werden (Myers, et al. 1992).

Die Rolle der humoralen Immunantwort bei der Pathogenese der EAE wurde bereits in einer Vielzahl unterschiedlicher Modelle untersucht. Zwar wird sowohl bei der EAE als auch bei der Multiplen Sklerose T-Zell-vermittelten Mechanismen eine zentrale Rolle eingeräumt. Bei bestimmten EAE-Modellen bzw. Subtypen der MS kommt B-Zell- bzw. antikörpervermittelten Effektormechanismen darüber hinaus jedoch eine wesentliche Bedeutung zu. Die proinflammatorische bzw. demyelinisierende Wirkung von Antikörpern kann hierbei auf unterschiedlichen Wegen vermittelt werden, die im Folgenden aufgeführt sind:

- **Aktivierung der Komplementkaskade:** Destruktion der Zielzelle durch den membranangreifenden Komplex (membrane-attack Complex, MAC) (Storch, et al. 1998). Das demyelinisierende Potential von Antikörpern scheint wesentlich von deren Fähigkeit zur Komplementaktivierung abzuhängen (Piddlesden, et al. 1993).
- **Antikörpervermittelte zelluläre Toxizität (antibody dependent cellular cytotoxicity, ADCC):** Bindung und Aktivierung von Effektorzellen des unspezifischen Immunsystems mit zytotoxischer Wirkung, z.B. NK-Zellen über den Fc-gamma-Rezeptor von an Myelin gebundenen Antikörpern (Schluesener, et al. 1987; Zhou, et al. 2006).
- **Opsonisierung und Phagozytose:** Fc-gamma-Rezeptor-vermittelte Phagozytose, z.B. durch Makrophagen. Sowohl in MS- als auch in EAE-Läsionen konnten innerhalb phagozytierender Zellen Komplexe aus Immunglobulinen und Myelinbestandteilen nachgewiesen werden (Genain, et al. 1999).
- **Direkte demyelinisierende Wirkung durch Antikörperbindung:** Ein Crosslinking myelingegebener Antikörper führt zur Phosphorylierung von Proteinen, die mit einer zellulären Stressantwort bzw. der Stabilität des Zytoskeletts assoziiert sind (Whitney, et al. 1999; Marta, et al. 2005a).

Neben den direkt durch Antikörper vermittelten Mechanismen der Demyelinisierung scheint die reziproke Interaktion zwischen B- und T-Zellen eine wesentliche Rolle im Krankheitsverlauf zu spielen. In unterschiedlichen EAE Modellen zeigt sich, dass bei einer aktiven Immunisierung je nach eingesetztem Antigen B-Zell-vermittelte Effektormechanismen von unterschiedlicher Bedeutung sind:

Bei B-Zell-defizienten C57BL/6-Mäusen kann im Gegensatz zu Wildtyp-Tieren eine EAE nicht durch Immunisierung mit einem rekombinanten MOG-Protein (rMOG) induziert werden. Bei Applikation des enzephalitogenen MOG-Peptides 35-55 zeigen sich hingegen keine Unterschiede zwischen B-Zell-defizienten Tieren und der Wildtypgruppe (Lyons, et al. 1999). Nach Rekonstitution von B-Zell-defizienten C57BL/6-Mäusen mit zuvor aktivierten B-Zellen kann auch durch Immunisierung mit rMOG eine EAE induziert werden (Lyons, et al. 2002). Die Induktion einer EAE durch aktive Immunisierung ist in B-Zell-defizienten Tieren also nur durch Peptide möglich, die MHC-restringiert von T-Zellen erkannt werden. Nach Transfer zuvor aktivierter B-Zellen gelingt eine aktive Immunisierung allerdings auch mit Proteinen, wie z.B. rMOG, bei denen Konformationsepitope durch Antikörper detektiert werden.

B-Zellen scheinen bei der EAE eine wichtige Rolle als antigenpräsentierende Zellen zu spielen. In einer Arbeit von Bettelli wurden transgene Mäuse, die ausschließlich MOG-35-55-spezifische T-Zell-Rezeptoren exprimieren, mit knock-in Mäusen gekreuzt, bei denen ca. ein Drittel der B-Zellen spezifisch für MOG ist. Von den hierbei generierten Tieren entwickelten ca. 60% spontan eine EAE mit klinisch schwerem Verlauf. Histopathologische Untersuchungen zeigten, dass bei den erkrankten Tieren v.a. der Nervus opticus sowie das Rückenmark betroffen waren. Dieses Verteilungsmuster wird mit dem höheren Anteil von MOG in den Myelinscheiden des N. opticus bzw. des Rückenmarks in Zusammenhang gebracht (Bettelli, et al. 2006; Krishnamoorthy, et al. 2006). Ein ähnliches Verteilungsmuster der Läsionen zeigte sich auch in der durch T_H2 -Transfer induzierten EAE bei SJL-Mäusen (Nessler 2005).

Die direkte Interaktion zwischen B- und T-Zellen scheint sowohl bei der MS als auch bei einer Vielzahl von EAE-Modellen eine wesentliche Rolle zu spielen. Die Ausbildung von ektopten Lymphfollikeln bzw. von B-Zell-Infiltraten im Bereich der Meningen deuten auf eine ektope B-Zellreifung innerhalb des ZNS hin, die zur Aufrechterhaltung bzw. weiteren Fokussierung der Immunantwort beizutragen scheint (Magliozzi, et al. 2004; Serafini, et al. 2004). Der anhaltende Nachweis myelinpeptidspezifischer IgM-Antikörper auch in der chronischen Phase der durch adoptiven T_H2 -Transfer

induzierten EAE unterstreicht die Bedeutung dieser Mechanismen im hier verwendeten Modell (Nessler 2005).

Arbeiten mit B-Zell-defizienten Tieren konnten darüber hinaus auch eine zusätzliche immunmodulatorische Funktion der B-Zellen bzw. bestimmter B-Zell-Subpopulationen in der akuten Erkrankungsphase nachweisen. So kann in B-Zell-defizienten B10.PL-Mäusen durch Immunisierung mit MBP1-11 eine EAE induziert werden. Bezüglich der Schwere des klinischen Verlaufs lassen sich zunächst keine Unterschiede zu Wildtypkontrollen beobachten. Bei B-Zell-defizienten Mäusen kommt es jedoch zu einer langsameren Rückbildung der klinischen Symptomatik (Wolf, et al. 1996). In einer Arbeit von Fillatreau konnte gezeigt werden, dass die Produktion von IL-10 durch B-Zellen wesentlich zur Regulation autoimmunologischer Prozesse beitragen kann (Fillatreau, et al. 2002). Eine Arbeit von Matsushita konnte die regulatorische Funktion von B-Zellen in unterschiedlichen Phasen eines T-Zell-Transfer EAE-Modells weiter charakterisieren (Matsushita, et al. 2008). Hierzu erfolgte eine B-Zell-Depletion mit einem gegen CD20 gerichteten Antikörper (Uchida, et al. 2004). Eine frühe Depletion ca. 7 Tage vor EAE Induktion führte zu einem schwereren Krankheitsverlauf. Bei einer Depletion an Tag 7 zeigte sich kein Unterschied. Eine B-Zell-Depletion an Tag 14 hingegen führte zu einer dramatischen Reduktion der klinischen Symptomatik. Als regulatorische B-Zell-Subpopulation konnten die IL-10 produzierenden CD1d^{hi}CD5⁺ B-Zellen (B10 Zellen) identifiziert werden. Ein Transfer dieser B10-Zellen in der frühen Phase der Erkrankung konnte zu einer deutlichen Reduktion der klinischen Symptomatik führen. Die Ergebnisse der Arbeit von Matsushita unterstreichen die reziproken regulatorischen Funktionen von B-Zellen im Verlauf der EAE-Pathogenese. Während B10-Zellen einerseits durch IL-10 Sekretion insbesondere in der Frühphase einen krankheitsupprimierenden Effekt haben, fungieren B-Zellen im späteren Verlauf als potente antigenpräsentierende Zellen für CD4⁺ T-Zellen und unterstützen durch deren Aktivierung das Eindringen enzephalitogener T-Zellen ins ZNS.

B-Zell-vermittelten Effektormechanismen kommt eine wichtige Rolle bei der Pathogenese der EAE zu. B-Zellen haben hierbei reziproke Funktionen. Subpopulationen wie die B10-Zellen üben über die Sekretion von IL-10 regulatorische Funktionen aus. Andererseits fungieren B-Zellen als antigenpräsentierende Zellen und spielen daher eine wichtige Rolle bei der T-Zell-Aktivierung. Darüber hinaus zeigt sich, dass antikörpervermittelte Mechanismen zwar nicht zur EAE-Induktion erforderlich sind, eine Demyelinisierung jedoch beschleunigen können. Die Rolle B-Zell- bzw.

antikörpervermittelter Effektormechanismen variiert darüber hinaus je nach EAE-Modell bzw. MS-Phänotyp.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die Rolle antikörpervermittelter Effektormechanismen im zu Beginn beschriebenen Modell einer T_H2-induzierten EAE weiter beleuchtet werden. Der Transfer PLP 139-151 spezifischer 3-3 Zellen führte neben Induktion einer EAE mit chronischem Verlauf zu einer humoralen Immunantwort, die sich im Verlauf rasch auf weitere Myelinantigene ausdehnt. Die Charakterisierung hier gewonnener monoklonaler myelinspezifischer Antikörper zeigt, dass PLP 139-151 spezifische Antikörper im vorliegenden Modell *nicht* in der Lage waren, Myelin in Gewebsschnitten spezifisch zu färben. Darüber hinaus konnte nach adoptivem Transfer *keine* krankheitsinduzierende Wirkung nachgewiesen werden. Es konnte eine Reihe MOG 35-55 spezifischer Antikörper generiert werden, die Myelin in Gewebsschnitten spezifisch färbten. Eine krankheitsmodifizierende Funktion nach adoptivem Transfer konnte ebenfalls *nicht* nachgewiesen werden.

Zur weiteren Klärung der Rolle antikörpervermittelter Mechanismen im hier beschriebenen Modell ist daher eine Charakterisierung der monoklonalen Antikörper hinsichtlich ihrer Effektorfunktionen, wie z.B. ihrer Fähigkeit zur Komplementaktivierung, erforderlich. Zudem bedarf es weiterer Untersuchungen zur Verteilungskinetik nach peripherer Applikation. Ein weiteres Augenmerk muss der weiteren Charakterisierung der T-Zell-B-Zell-Interaktion in vivo gelten. Letztlich bleibt festzuhalten, dass von der Charakterisierung einzelner monoklonaler Antikörper nur bedingt auf das pathogenetische Potential der myelinspezifischen Antikörperantwort in vivo geschlossen werden kann.

7 Liste der verwendeten Abkürzungen

BSA	Bovines Serumalbumin
CD	Cluster of Differentiation
CFA	Komplettes Freundsches Adjuvans
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiotreitol
EAE	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis-2-aminoethyl-tetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked-immunoabsorbent-assay
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FoxP3	Forkhead box P3
GA	Glatirameracetat
HBSS	Hanks Balanced Salt Solution
HE	Hämatoxylin-Eosin
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
HRP	Horseradish Peroxidase (Meerrettich-Peroxidase)
IFA	Inkomplettes Freundsches Adjuvans
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
LDS	Lithium Dodecyl Sulfate (Lithium-Lauroylsulfat)
LDS-PAGE	LDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese
LFB	Luxol Fast Blue / Kresylviolett
MBP	Myelinbasisches Protein
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MHC	Major histocompatibility complex
MOG	Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
MS	Multiple Sklerose
NK-T-Zellen	Natural-Killer-T-Zellen
OD	Optische Dichte bzw. Extinktion

PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PIPES	Piperazin-N,N'-bis-Ethansulfonsäure
PLP	Proteolipidprotein
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PP-MS	Primär-progrediente MS
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RPM	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RR-MS	Relapsing-remitting MS = schubförmige MS
SD	Standard Deviation = Standardabweichung
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electro- phoresis
SP-MS	Sekundär-progrediente MS
TGF	Transforming growth factor
TNF	Tumor-Nekrosis-Faktor
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TWEEN 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
ZNS	Zentrales Nervensystem

8 Literaturverzeichnis

Akerstrom, B., Brodin, T., Reis, K. and Bjorck, L. (1985). Protein G: a powerful tool for binding and detection of monoclonal and polyclonal antibodies. J Immunol **135** (4) 2589-92

Allen, D., Cumano, A., Dildrop, R., Kocks, C., Rajewsky, K., Rajewsky, N., Roes, J., Sablitzky, F. and Siekevitz, M. (1987). Timing, genetic requirements and functional consequences of somatic hypermutation during B-cell development. Immunol Rev **96** 5-22

Amor, S., Baker, D., Groome, N. and Turk, J. L. (1993). Identification of a major encephalitogenic epitope of proteolipid protein (residues 56-70) for the induction of experimental allergic encephalomyelitis in Biozzi AB/H and nonobese diabetic mice. J Immunol **150** (12) 5666-72

Anderson, A. C., Nicholson, L. B., Legge, K. L., Turchin, V., Zaghouani, H. and Kuchroo, V. K. (2000). High frequency of autoreactive myelin proteolipid protein-specific T cells in the periphery of naive mice: mechanisms of selection of the self-reactive repertoire. J Exp Med **191** (5) 761-70

Arnon, R. (1996). The development of Cop 1 (Copaxone), an innovative drug for the treatment of multiple sclerosis: personal reflections. Immunol Lett **50** (1-2) 1-15

Arvanitis, D. N., Yang, W. and Boggs, J. M. (2002). Myelin proteolipid protein, basic protein, the small isoform of myelin-associated glycoprotein, and p42MAPK are associated in the Triton X-100 extract of central nervous system myelin. J Neurosci Res **70** (1) 8-23

Baranzini, S. E., Jeong, M. C., Butunoi, C., Murray, R. S., Bernard, C. C. and Oksenberg, J. R. (1999). B cell repertoire diversity and clonal expansion in multiple sclerosis brain lesions. J Immunol **163** (9) 5133-44

Batoulis, H., Addicks, K. and Kuerten, S. (2010). Emerging concepts in autoimmune encephalomyelitis beyond the CD4/T(H)1 paradigm. Ann Anat **192** (4) 179-93

Ben-Nun, A. and Cohen, I. R. (1982). Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) mediated by T cell lines: process of selection of lines and characterization of the cells. J Immunol **129** (1) 303-8

Bernard, C. C. and Carnegie, P. R. (1975). Experimental autoimmune encephalomyelitis in mice: immunologic response to mouse spinal cord and myelin basic proteins. J Immunol **114** (5) 1537-40

Bettelli, E., Baeten, D., Jager, A., Sobel, R. A. and Kuchroo, V. K. (2006). Myelin oligodendrocyte glycoprotein-specific T and B cells cooperate to induce a Devic-like disease in mice. J Clin Invest **116** (9) 2393-402

Bettelli, E., Das, M. P., Howard, E. D., Weiner, H. L., Sobel, R. A. and Kuchroo, V. K. (1998). IL-10 is critical in the regulation of autoimmune encephalomyelitis as demonstrated by studies of IL-10- and IL-4-deficient and transgenic mice. J Immunol **161** (7) 3299-306

Briere, F., Servet-Delprat, C., Bridon, J. M., Saint-Remy, J. M. and Banchereau, J. (1994). Human interleukin 10 induces naive surface immunoglobulin D+ (sIgD+) B cells to secrete IgG1 and IgG3. J Exp Med **179** (2) 757-62

Brinkmann, V., Billich, A., Baumruker, T., Heining, P., Schmouder, R., Francis, G., Aradhye, S. and Burtin, P. (2010). Fingolimod (FTY720): discovery and development of an oral drug to treat multiple sclerosis. Nat Rev Drug Discov **9** (11) 883-97

Buljevac, D., Flach, H. Z., Hop, W. C., Hijdra, D., Laman, J. D., Savelkoul, H. F., van Der Meche, F. G., van Doorn, P. A. and Hintzen, R. Q. (2002). Prospective study on the relationship between infections and multiple sclerosis exacerbations. Brain **125** (Pt 5) 952-60

Cash, E., Minty, A., Ferrara, P., Caput, D., Fradelizi, D. and Rott, O. (1994). Macrophage-inactivating IL-13 suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis in rats. J Immunol **153** (9) 4258-67

Cepok, S., Jacobsen, M., Schock, S., Omer, B., Jaekel, S., Boddeker, I., Oertel, W. H., Sommer, N. and Hemmer, B. (2001). Patterns of cerebrospinal fluid pathology correlate with disease progression in multiple sclerosis. Brain **124** (Pt 11) 2169-76

Chou, C. H., Fritz, R. B., Chou, F. C. and Kibler, R. F. (1979). The immune response of Lewis rats to peptide 68-88 of guinea pig myelin basic protein. I. T cell determinants. J Immunol **123** (4) 1540-3

Coffman, R. L., Lebman, D. A. and Rothman, P. (1993). Mechanism and regulation of immunoglobulin isotype switching. Adv Immunol **54** 229-70

Coller, H. A. and Coller, B. S. (1983). Statistical analysis of repetitive subcloning by the limiting dilution technique with a view toward ensuring hybridoma monoclonality. Hybridoma **2** (1) 91-6

Compston, A. and Coles, A. (2002). Multiple sclerosis. Lancet **359** (9313) 1221-31

Constant, S., Sant'Angelo, D., Pasqualini, T., Taylor, T., Levin, D., Flavell, R. and Bottomly, K. (1995a). Peptide and protein antigens require distinct antigen-presenting cell subsets for the priming of CD4+ T cells. J Immunol **154** (10) 4915-23

Constant, S., Schweitzer, N., West, J., Ranney, P. and Bottomly, K. (1995b). B lymphocytes can be competent antigen-presenting cells for priming CD4+ T cells to protein antigens in vivo. J Immunol **155** (8) 3734-41

Cook, G. P. and Tomlinson, I. M. (1995). The human immunoglobulin VH repertoire. Immunol Today **16** (5) 237-42

Cross, A. H., Trotter, J. L. and Lyons, J. (2001). B cells and antibodies in CNS demyelinating disease. J Neuroimmunol **112** (1-2) 1-14

Davis, M. M. and Bjorkman, P. J. (1988). T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. Nature **334** (6181) 395-402

- Dyment, D. A., Ebers, G. C. and Sadovnick, A. D. (2004). Genetics of multiple sclerosis. Lancet Neurol **3** (2) 104-10
- Eckert W.A. and Kartenbeck, J. (1997) Proteine: Standardmethoden der Molekular- und Zellbiologie Springer, Heidelberg: 1 - 23
- Fagarasan, S. and Honjo, T. (2000). T-Independent immune response: new aspects of B cell biology. Science **290** (5489) 89-92
- Fidler, J. M., DeJoy, S. Q. and Gibbons, J. J., Jr. (1986a). Selective immunomodulation by the antineoplastic agent mitoxantrone. I. Suppression of B lymphocyte function. J Immunol **137** (2) 727-32
- Fidler, J. M., DeJoy, S. Q., Smith, F. R., 3rd and Gibbons, J. J., Jr. (1986b). Selective immunomodulation by the antineoplastic agent mitoxantrone. II. Nonspecific adherent suppressor cells derived from mitoxantrone-treated mice. J Immunol **136** (8) 2747-54
- Fillatreau, S., Sweeney, C. H., McGeachy, M. J., Gray, D. and Anderton, S. M. (2002). B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. Nat Immunol **3** (10) 944-50
- Finger, U. B., Brummer, W., Knieps, E., Thommes, J. and Kula, M. R. (1996). Investigations on the specificity of thiophilic interaction for monoclonal antibodies of different subclasses. J Chromatogr B Biomed Appl **675** (2) 197-204
- Fridkis-Hareli, M. and Strominger, J. L. (1998). Promiscuous binding of synthetic copolymer 1 to purified HLA-DR molecules. J Immunol **160** (9) 4386-97
- Fritz, R. B., Chou, C. H. and McFarlin, D. E. (1983a). Induction of experimental allergic encephalomyelitis in PL/J and (SJL/J x PL/J)F1 mice by myelin basic protein and its peptides: localization of a second encephalitogenic determinant. J Immunol **130** (1) 191-4
- Fritz, R. B., Chou, C. H. and McFarlin, D. E. (1983b). Relapsing murine experimental allergic encephalomyelitis induced by myelin basic protein. J Immunol **130** (3) 1024-6

Fritz, R. B., Skeen, M. J. and Ziegler, H. K. (1985). Influence of the H-2u haplotype on immune function in F1 hybrid mice. I. Antigen presentation. J Immunol **134** (6) 3574-9

Galfre, G., Howe, S. C., Milstein, C., Butcher, G. W. and Howard, J. C. (1977). Antibodies to major histocompatibility antigens produced by hybrid cell lines. Nature **266** (5602) 550-2

Garboczi, D. N., Ghosh, P., Utz, U., Fan, Q. R., Biddison, W. E. and Wiley, D. C. (1996). Structure of the complex between human T-cell receptor, viral peptide and HLA-A2. Nature **384** (6605) 134-41

Garcia, K. C., Degano, M., Stanfield, R. L., Brunmark, A., Jackson, M. R., Peterson, P. A., Teyton, L. and Wilson, I. A. (1996a). An alphabeta T cell receptor structure at 2.5 Å and its orientation in the TCR-MHC complex. Science **274** (5285) 209-19

Garcia, K. C., Scott, C. A., Brunmark, A., Carbone, F. R., Peterson, P. A., Wilson, I. A. and Teyton, L. (1996b). CD8 enhances formation of stable T-cell receptor/MHC class I molecule complexes. Nature **384** (6609) 577-81

Garside, P., Ingulli, E., Merica, R. R., Johnson, J. G., Noelle, R. J. and Jenkins, M. K. (1998). Visualization of specific B and T lymphocyte interactions in the lymph node. Science **281** (5373) 96-9

Gay, F. W., Drye, T. J., Dick, G. W. and Esiri, M. M. (1997). The application of multifactorial cluster analysis in the staging of plaques in early multiple sclerosis. Identification and characterization of the primary demyelinating lesion. Brain **120** (Pt 8) 1461-83

Genain, C. P., Abel, K., Belmar, N., Villinger, F., Rosenberg, D. P., Linington, C., Raine, C. S. and Hauser, S. L. (1996). Late complications of immune deviation therapy in a nonhuman primate. Science **274** (5295) 2054-7

Genain, C. P., Cannella, B., Hauser, S. L. and Raine, C. S. (1999). Identification of autoantibodies associated with myelin damage in multiple sclerosis. Nat Med **5** (2) 170-5

- Gerritse, K., Deen, C., Fasbender, M., Ravid, R., Boersma, W. and Claassen, E. (1994). The involvement of specific anti myelin basic protein antibody-forming cells in multiple sclerosis immunopathology. J Neuroimmunol **49** (1-2) 153-9
- Gold, R., Jawad, A., Miller, D. H., Henderson, D. C., Fassas, A., Fierz, W. and Hartung, H. P. (2007). Expert opinion: guidelines for the use of natalizumab in multiple sclerosis patients previously treated with immunomodulating therapies. J Neuroimmunol **187** (1-2) 156-8
- Greer, J. M., Kuchroo, V. K., Sobel, R. A. and Lees, M. B. (1992). Identification and characterization of a second encephalitogenic determinant of myelin proteolipid protein (residues 178-191) for SJL mice. J Immunol **149** (3) 783-8
- Gronen, F., Ruprecht, K., Weissbrich, B., Klinker, E., Kroner, A., Hofstetter, H. H. and Rieckmann, P. (2006). Frequency analysis of HLA-B7-restricted Epstein-Barr virus-specific cytotoxic T lymphocytes in patients with multiple sclerosis and healthy controls. J Neuroimmunol **180** (1-2) 185-92
- Hillert, J. and Olerup, O. (1993). Multiple sclerosis is associated with genes within or close to the HLA-DR-DQ subregion on a normal DR15,DQ6,Dw2 haplotype. Neurology **43** (1) 163-8
- Hjelmstrom, P. (2001). Lymphoid neogenesis: de novo formation of lymphoid tissue in chronic inflammation through expression of homing chemokines. J Leukoc Biol **69** (3) 331-9
- Hofstetter, H. H., Shive, C. L. and Forsthuber, T. G. (2002). Pertussis toxin modulates the immune response to neuroantigens injected in incomplete Freund's adjuvant: induction of Th1 cells and experimental autoimmune encephalomyelitis in the presence of high frequencies of Th2 cells. J Immunol **169** (1) 117-25
- Huseby, E. S., Liggitt, D., Brabb, T., Schnabel, B., Ohlen, C. and Goverman, J. (2001). A pathogenic role for myelin-specific CD8(+) T cells in a model for multiple sclerosis. J Exp Med **194** (5) 669-76

- Jacob, J., Kassir, R. and Kelsoe, G. (1991). In situ studies of the primary immune response to (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl. I. The architecture and dynamics of responding cell populations. J Exp Med **173** (5) 1165-75
- Jager, A., Dardalhon, V., Sobel, R. A., Bettelli, E. and Kuchroo, V. K. (2009). Th1, Th17, and Th9 effector cells induce experimental autoimmune encephalomyelitis with different pathological phenotypes. J Immunol **183** (11) 7169-77
- Jameson, S. C. and Bevan, M. J. (1998). T-cell selection. Curr Opin Immunol **10** (2) 214-9
- Kabat, E. A., Moore, D. H. and Landow, H. (1942). An Electrophoretic Study of the Protein Components in Cerebrospinal Fluid and Their Relationship to the Serum Proteins. J Clin Invest **21** (5) 571-7
- Kalbus, M., Fleckenstein, B. T., Offenhausser, M., Bluggel, M., Melms, A., Meyer, H. E., Rammensee, H. G., Martin, R., Jung, G. and Sommer, N. (2001). Ligand motif of the autoimmune disease-associated mouse MHC class II molecule H2-A(s). Eur J Immunol **31** (2) 551-62
- Kalman, B., Alder, H. and Lublin, F. D. (1995). Characteristics of the T lymphocytes involved in experimental allergic encephalomyelitis. J Neuroimmunol **61** (2) 107-16
- Kaufman, D. I., Trobe, J. D., Eggenberger, E. R. and Whitaker, J. N. (2000). Practice parameter: the role of corticosteroids in the management of acute monosymptomatic optic neuritis. Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. Neurology **54** (11) 2039-44
- Keegan, M., Konig, F., McClelland, R., Bruck, W., Morales, Y., Bitsch, A., Panitch, H., Lassmann, H., Weinshenker, B., Rodriguez, M., Parisi, J. and Lucchinetti, C. F. (2005). Relation between humoral pathological changes in multiple sclerosis and response to therapeutic plasma exchange. Lancet **366** (9485) 579-82

- Keegan, M., Pineda, A. A., McClelland, R. L., Darby, C. H., Rodriguez, M. and Weinshenker, B. G. (2002). Plasma exchange for severe attacks of CNS demyelination: predictors of response. Neurology **58** (1) 143-6
- Kenny, G. E. and Dunsmoor, C. L. (1983). Principles, problems, and strategies in the use of antigenic mixtures for the enzyme-linked immunosorbent assay. J Clin Microbiol **17** (4) 655-65
- Kerlero de Rosbo, N., Honegger, P., Lassmann, H. and Matthieu, J. M. (1990). Demyelination induced in aggregating brain cell cultures by a monoclonal antibody against myelin/oligodendrocyte glycoprotein. J Neurochem **55** (2) 583-7
- Kerlero de Rosbo, N., Mendel, I. and Ben-Nun, A. (1995). Chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis with a delayed onset and an atypical clinical course, induced in PL/J mice by myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG)-derived peptide: preliminary analysis of MOG T cell epitopes. Eur J Immunol **25** (4) 985-93
- Kim, J. I., Ho, I. C., Grusby, M. J. and Glimcher, L. H. (1999). The transcription factor c-Maf controls the production of interleukin-4 but not other Th2 cytokines. Immunity **10** (6) 745-51
- Kim, J. M., Rasmussen, J. P. and Rudensky, A. Y. (2007). Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice. Nat Immunol **8** (2) 191-7
- Klinman, N. R. (1996). The "clonal selection hypothesis" and current concepts of B cell tolerance. Immunity **5** (3) 189-95
- Kohler, G. and Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature **256** (5517) 495-7
- Komiyama, Y., Nakae, S., Matsuki, T., Nambu, A., Ishigame, H., Kakuta, S., Sudo, K. and Iwakura, Y. (2006). IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. J Immunol **177** (1) 566-73

- Krakowski, M. and Owens, T. (1996). Interferon-gamma confers resistance to experimental allergic encephalomyelitis. Eur J Immunol **26** (7) 1641-6
- Krishnamoorthy, G., Lassmann, H., Wekerle, H. and Holz, A. (2006). Spontaneous optico-spinal encephalomyelitis in a double-transgenic mouse model of autoimmune T cell/B cell cooperation. J Clin Invest **116** (9) 2385-92
- Kuchroo, V. K., Anderson, A. C., Waldner, H., Munder, M., Bettelli, E. and Nicholson, L. B. (2002). T cell response in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE): role of self and cross-reactive antigens in shaping, tuning, and regulating the autopathogenic T cell repertoire. Annu Rev Immunol **20** 101-23
- Kuchroo, V. K., Martin, C. A., Greer, J. M., Ju, S. T., Sobel, R. A. and Dorf, M. E. (1993). Cytokines and adhesion molecules contribute to the ability of myelin proteolipid protein-specific T cell clones to mediate experimental allergic encephalomyelitis. J Immunol **151** (8) 4371-82
- Kuhlmann, T., Lingfeld, G., Bitsch, A., Schuchardt, J. and Bruck, W. (2002). Acute axonal damage in multiple sclerosis is most extensive in early disease stages and decreases over time. Brain **125** (Pt 10) 2202-12
- Kumanovics, A., Takada, T. and Lindahl, K. F. (2003). Genomic organization of the mammalian MHC. Annu Rev Immunol **21** 629-57
- Kurtzke, J. F. (1991). Multiple sclerosis: changing times. Neuroepidemiology **10** (1) 1-8
- Lafaille, J. J., Keere, F. V., Hsu, A. L., Baron, J. L., Haas, W., Raine, C. S. and Tonegawa, S. (1997). Myelin basic protein-specific T helper 2 (Th2) cells cause experimental autoimmune encephalomyelitis in immunodeficient hosts rather than protect them from the disease. J Exp Med **186** (2) 307-12
- Laman, J. D., Visser, L., Maassen, C. B., de Groot, C. J., de Jong, L. A., t Hart, B. A., van Meurs, M. and Schellekens, M. M. (2001). Novel monoclonal antibodies against proteolipid protein peptide 139-151 demonstrate demyelination and myelin uptake by macrophages in MS and marmoset EAE lesions. J Neuroimmunol **119** (1) 124-30

Lassmann, H. (1998) Pathology of multiple sclerosis McAlpine's multiple sclerosis London Churchill Livingstone **3**: 329-58

Lassmann, H., Bruck, W., Lucchinetti, C. and Rodriguez, M. (1997). Remyelination in multiple sclerosis. Mult Scler **3** (2) 133-6

Lassmann, H., Brunner, C., Bradl, M. and Linington, C. (1988). Experimental allergic encephalomyelitis: the balance between encephalitogenic T lymphocytes and demyelinating antibodies determines size and structure of demyelinated lesions. Acta Neuropathol **75** (6) 566-76

Linington, C., Berger, T., Perry, L., Weerth, S., Hinze-Selch, D., Zhang, Y., Lu, H. C., Lassmann, H. and Wekerle, H. (1993). T cells specific for the myelin oligodendrocyte glycoprotein mediate an unusual autoimmune inflammatory response in the central nervous system. Eur J Immunol **23** (6) 1364-72

Linington, C., Bradl, M., Lassmann, H., Brunner, C. and Vass, K. (1988). Augmentation of demyelination in rat acute allergic encephalomyelitis by circulating mouse monoclonal antibodies directed against a myelin/oligodendrocyte glycoprotein. Am J Pathol **130** (3) 443-54

Litzenburger, T., Fassler, R., Bauer, J., Lassmann, H., Linington, C., Wekerle, H. and Iglesias, A. (1998). B lymphocytes producing demyelinating autoantibodies: development and function in gene-targeted transgenic mice. J Exp Med **188** (1) 169-80

Lucchinetti, C., Bruck, W., Parisi, J., Scheithauer, B., Rodriguez, M. and Lassmann, H. (1999). A quantitative analysis of oligodendrocytes in multiple sclerosis lesions. A study of 113 cases. Brain **122** (Pt 12) 2279-95

Lucchinetti, C., Bruck, W., Parisi, J., Scheithauer, B., Rodriguez, M. and Lassmann, H. (2000). Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. Ann Neurol **47** (6) 707-17

Lyons, J. A., Ramsbottom, M. J. and Cross, A. H. (2002). Critical role of antigen-specific antibody in experimental autoimmune encephalomyelitis induced by recombinant myelin oligodendrocyte glycoprotein. Eur J Immunol **32** (7) 1905-13

Lyons, J. A., San, M., Happ, M. P. and Cross, A. H. (1999). B cells are critical to induction of experimental allergic encephalomyelitis by protein but not by a short encephalitogenic peptide. Eur J Immunol **29** (11) 3432-9

Magliozzi, R., Columba-Cabezas, S., Serafini, B. and Aloisi, F. (2004). Intracerebral expression of CXCL13 and BAFF is accompanied by formation of lymphoid follicle-like structures in the meninges of mice with relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. J Neuroimmunol **148** (1-2) 11-23

Marta, C. B., Montano, M. B., Taylor, C. M., Taylor, A. L., Bansal, R. and Pfeiffer, S. E. (2005a). Signaling cascades activated upon antibody cross-linking of myelin oligodendrocyte glycoprotein: potential implications for multiple sclerosis. J Biol Chem **280** (10) 8985-93

Marta, C. B., Oliver, A. R., Sweet, R. A., Pfeiffer, S. E. and Ruddle, N. H. (2005b). Pathogenic myelin oligodendrocyte glycoprotein antibodies recognize glycosylated epitopes and perturb oligodendrocyte physiology. Proc Natl Acad Sci U S A **102** (39) 13992-7

Martin, R. and McFarland, H. F. (1995). Immunological aspects of experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis. Crit Rev Clin Lab Sci **32** (2) 121-82

Matloubian, M., Lo, C. G., Cinamon, G., Lesneski, M. J., Xu, Y., Brinkmann, V., Allende, M. L., Proia, R. L. and Cyster, J. G. (2004). Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. Nature **427** (6972) 355-60

Matsushita, T., Yanaba, K., Bouaziz, J. D., Fujimoto, M. and Tedder, T. F. (2008). Regulatory B cells inhibit EAE initiation in mice while other B cells promote disease progression. J Clin Invest **118** (10) 3420-30

McDonald, W. I., Compston, A., Edan, G., Goodkin, D., Hartung, H. P., Lublin, F. D., McFarland, H. F., Paty, D. W., Polman, C. H., Reingold, S. C., Sandberg-Wollheim, M., Sibley, W., Thompson, A., van den Noort, S., Weinshenker, B. Y. and Wolinsky, J. S. (2001). Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. Ann Neurol **50** (1) 121-7

McFarlin, D. E. and McFarland, H. F. (1982a). Multiple sclerosis (first of two parts). N Engl J Med **307** (19) 1183-8

McFarlin, D. E. and McFarland, H. F. (1982b). Multiple sclerosis (second of two parts). N Engl J Med **307** (20) 1246-51

Medana, I. M. and Esiri, M. M. (2003). Axonal damage: a key predictor of outcome in human CNS diseases. Brain **126** (Pt 3) 515-30

Mendel, I., Kerlero de Rosbo, N. and Ben-Nun, A. (1995). A myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide induces typical chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in H-2b mice: fine specificity and T cell receptor V beta expression of encephalitogenic T cells. Eur J Immunol **25** (7) 1951-9

Merkler, D., Schmelting, B., Czeh, B., Fuchs, E., Stadelmann, C. and Bruck, W. (2006). Myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced experimental autoimmune encephalomyelitis in the common marmoset reflects the immunopathology of pattern II multiple sclerosis lesions. Mult Scler **12** (4) 369-74

Myers, K. J., Sprent, J., Dougherty, J. P. and Ron, Y. (1992). Synergy between encephalitogenic T cells and myelin basic protein-specific antibodies in the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. J Neuroimmunol **41** (1) 1-8

Nessler, S. 2005 Klonale experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis: T-Zell-Charakteristika bestimmen die Läsionspathologie. Inaugural-Dissertation. Fachbereich Medizin der Philipps Universität Marburg

Neuberger, M. S. and Milstein, C. (1995). Somatic hypermutation. Curr Opin Immunol **7** (2) 248-54

Neuhaus, O., Farina, C., Wekerle, H. and Hohlfeld, R. (2001). Mechanisms of action of glatiramer acetate in multiple sclerosis. Neurology **56** (6) 702-8

Neuhaus, O., Wiendl, H., Kieseier, B. C., Archelos, J. J., Hemmer, B., Stuve, O. and Hartung, H. P. (2005). Multiple sclerosis: Mitoxantrone promotes differential effects on immunocompetent cells in vitro. J Neuroimmunol **168** (1-2) 128-37

Noseworthy, J. H., Lucchinetti, C., Rodriguez, M. and Weinshenker, B. G. (2000). Multiple sclerosis. N Engl J Med **343** (13) 938-52

O'Connor, R. A., Prendergast, C. T., Sabatos, C. A., Lau, C. W., Leech, M. D., Wraith, D. C. and Anderton, S. M. (2008). Cutting edge: Th1 cells facilitate the entry of Th17 cells to the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis. J Immunol **181** (6) 3750-4

Offner, H., Buenafe, A. C., Vainiene, M., Celnik, B., Weinberg, A. D., Gold, D. P., Hashim, G. and Vandenberg, A. A. (1993). Where, when, and how to detect biased expression of disease-relevant V beta genes in rats with experimental autoimmune encephalomyelitis. J Immunol **151** (1) 506-17

Owens, G. P., Kraus, H., Burgoon, M. P., Smith-Jensen, T., Devlin, M. E. and Gilden, D. H. (1998). Restricted use of VH4 germline segments in an acute multiple sclerosis brain. Ann Neurol **43** (2) 236-43

Pene, J., Rousset, F., Briere, F., Chretien, I., Paliard, X., Banchereau, J., Spits, H. and De Vries, J. E. (1988). IgE production by normal human B cells induced by alloreactive T cell clones is mediated by IL-4 and suppressed by IFN-gamma. J Immunol **141** (4) 1218-24

Petersen, T. R., Bettelli, E., Sidney, J., Sette, A., Kuchroo, V. and Backstrom, B. T. (2004). Characterization of MHC- and TCR-binding residues of the myelin oligodendrocyte glycoprotein 38-51 peptide. Eur J Immunol **34** (1) 165-73

- Pette, M., Pette, D. F., Muraro, P. A., Farnon, E., Martin, R. and McFarland, H. F. (1997). Interferon-beta interferes with the proliferation but not with the cytokine secretion of myelin basic protein-specific, T-helper type 1 lymphocytes. Neurology **49** (2) 385-92
- Pettinelli, C. B. and McFarlin, D. E. (1981). Adoptive transfer of experimental allergic encephalomyelitis in SJL/J mice after in vitro activation of lymph node cells by myelin basic protein: requirement for Lyt 1+ 2- T lymphocytes. J Immunol **127** (4) 1420-3
- Piddlesden, S. J., Lassmann, H., Zimprich, F., Morgan, B. P. and Linington, C. (1993). The demyelinating potential of antibodies to myelin oligodendrocyte glycoprotein is related to their ability to fix complement. Am J Pathol **143** (2) 555-64
- Poser, C. M., Paty, D. W., Scheinberg, L., McDonald, W. I., Davis, F. A., Ebers, G. C., Johnson, K. P., Sibley, W. A., Silberberg, D. H. and Tourtellotte, W. W. (1983). New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. Ann Neurol **13** (3) 227-31
- Qin, Y., Duquette, P., Zhang, Y., Olek, M., Da, R. R., Richardson, J., Antel, J. P., Talbot, P., Cashman, N. R., Tourtellotte, W. W., Wekerle, H. and Van Den Noort, S. (2003). Intrathecal B-cell clonal expansion, an early sign of humoral immunity, in the cerebrospinal fluid of patients with clinically isolated syndrome suggestive of multiple sclerosis. Lab Invest **83** (7) 1081-8
- Qin, Y., Duquette, P., Zhang, Y., Talbot, P., Poole, R. and Antel, J. (1998). Clonal expansion and somatic hypermutation of V(H) genes of B cells from cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. J Clin Invest **102** (5) 1045-50
- Racke, M. K., Bonomo, A., Scott, D. E., Cannella, B., Levine, A., Raine, C. S., Shevach, E. M. and Rocken, M. (1994). Cytokine-induced immune deviation as a therapy for inflammatory autoimmune disease. J Exp Med **180** (5) 1961-6
- Racke, M. K., Dhib-Jalbut, S., Cannella, B., Albert, P. S., Raine, C. S. and McFarlin, D. E. (1991). Prevention and treatment of chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis by transforming growth factor-beta 1. J Immunol **146** (9) 3012-7

Raine, C. S., Cannella, B., Hauser, S. L. and Genain, C. P. (1999). Demyelination in primate autoimmune encephalomyelitis and acute multiple sclerosis lesions: a case for antigen-specific antibody mediation. Ann Neurol **46** (2) 144-60

Ransohoff, R. M. (2007). Natalizumab for multiple sclerosis. N Engl J Med **356** (25) 2622-9

Rep, M. H., Schrijver, H. M., van Lopik, T., Hintzen, R. Q., Roos, M. T., Ader, H. J., Polman, C. H. and van Lier, R. A. (1999). Interferon (IFN)-beta treatment enhances CD95 and interleukin 10 expression but reduces interferon-gamma producing T cells in MS patients. J Neuroimmunol **96** (1) 92-100

Rivers, T. M., Sprunt, D. H. and Berry, G. P. (1933). Observations on Attempts to Produce Acute Disseminated Encephalomyelitis in Monkeys. J Exp Med **58** (1) 39-53

Rocken, M., Racke, M. and Shevach, E. M. (1996). IL-4-induced immune deviation as antigen-specific therapy for inflammatory autoimmune disease. Immunol Today **17** (5) 225-31

Romagnani, S. (1997). The Th1/Th2 paradigm. Immunol Today **18** (6) 263-6

Ruprecht, K., Obojes, K., Wengel, V., Gronen, F., Kim, K. S., Perron, H., Schneider-Schaulies, J. and Rieckmann, P. (2006). Regulation of human endogenous retrovirus W protein expression by herpes simplex virus type 1: implications for multiple sclerosis. J Neurovirol **12** (1) 65-71

Sadovnick, A. D., Armstrong, H., Rice, G. P., Bulman, D., Hashimoto, L., Paty, D. W., Hashimoto, S. A., Warren, S., Hader, W., Murray, T. J. and et al. (1993a). A population-based study of multiple sclerosis in twins: update. Ann Neurol **33** (3) 281-5

Sadovnick, A. D. and Ebers, G. C. (1993b). Epidemiology of multiple sclerosis: a critical overview. Can J Neurol Sci **20** (1) 17-29

Sakai, K., Zamvil, S. S., Mitchell, D. J., Lim, M., Rothbard, J. B. and Steinman, L. (1988). Characterization of a major encephalitogenic T cell epitope in SJL/J mice with synthetic oligopeptides of myelin basic protein. J Neuroimmunol **19** (1-2) 21-32

Sanderson, C. J. (1992). Interleukin-5, eosinophils, and disease. Blood **79** (12) 3101-9

Sawcer, S., Hellenthal, G., Pirinen, M., Spencer, C. C., Patsopoulos, N. A., Moutsianas, L., Dilthey, A., Su, Z., Freeman, C., Hunt, S. E., Ekins, S., Gray, E., Booth, D. R., Potter, S. C., Goris, A., Band, G., Oturai, A. B., Strange, A., Saarela, J., Bellenguez, C., Fontaine, B., Gillman, M., Hemmer, B., Gwilliam, R., Zipp, F., Jayakumar, A., Martin, R., Leslie, S., Hawkins, S., Giannoulatou, E., D'Alfonso, S., Blackburn, H., Boneschi, F. M., Liddle, J., Harbo, H. F., Perez, M. L., Spurkland, A., Waller, M. J., Mycko, M. P., Ricketts, M., Comabella, M., Hammond, N., Kockum, I., McCann, O. T., Ban, M., Whittaker, P., Kempainen, A., Weston, P., Hawkins, C., Widaa, S., Zajicek, J., Dronov, S., Robertson, N., Bumpstead, S. J., Barcellos, L. F., Ravindrarajah, R., Abraham, R., Alfredsson, L., Ardlie, K., Aubin, C., Baker, A., Baker, K., Baranzini, S. E., Bergamaschi, L., Bergamaschi, R., Bernstein, A., Berthele, A., Boggild, M., Bradfield, J. P., Brassat, D., Broadley, S. A., Buck, D., Butzkueven, H., Capra, R., Carroll, W. M., Cavalla, P., Celius, E. G., Cepok, S., Chiavacci, R., Clerget-Darpoux, F., Clysters, K., Comi, G., Cossburn, M., Cournu-Rebeix, I., Cox, M. B., Cozen, W., Cree, B. A., Cross, A. H., Cusi, D., Daly, M. J., Davis, E., de Bakker, P. I., Debouverie, M., D'Hooghe M, B., Dixon, K., Dobosi, R., Dubois, B., Ellinghaus, D., Elovaara, I., Esposito, F., Fontenille, C., Foote, S., Franke, A., Galimberti, D., Ghezzi, A., Glessner, J., Gomez, R., Gout, O., Graham, C., Grant, S. F., Guerini, F. R., Hakonarson, H., Hall, P., Hamsten, A., Hartung, H. P., Heard, R. N., Heath, S., Hobart, J., Hoshi, M., Infante-Duarte, C., Ingram, G., Ingram, W., Islam, T., Jagodic, M., Kabesch, M., Kermode, A. G., Kilpatrick, T. J., Kim, C., Klopp, N., Koivisto, K., Larsson, M., Lathrop, M., Lechner-Scott, J. S., Leone, M. A., Leppa, V., Liljedahl, U., Bomfim, I. L., Lincoln, R. R., Link, J., Liu, J., Lorentzen, A. R., Lupoli, S., Macciardi, F., Mack, T., Marriott, M., Martinelli, V., Mason, D., McCauley, J. L., Mentch, F., Mero, I. L., Mihalova, T., Montalban, X., Mottershead, J., Myhr, K. M., Naldi, P., Ollier, W., Page, A., Palotie, A., Pelletier, J., Piccio, L., Pickersgill, T., Piehl, F., Pobywajlo, S., Quach, H. L., Ramsay, P. P., Reunanen, M., Reynolds, R., Rioux, J. D., Rodegher, M., Roesner, S., Rubio, J. P., Ruckert, I. M., Salvetti, M., Salvi, E., Santaniello, A., Schaefer, C. A., Schreiber, S., Schulze, C., Scott, R. J., Sellebjerg, F., Selmaj, K. W., Sexton, D., Shen,

L., Simms-Acuna, B., Skidmore, S., Sleiman, P. M., Smestad, C., Sorensen, P. S., Sondergaard, H. B., Stankovich, J., Strange, R. C., Sulonen, A. M., Sundqvist, E., Syvanen, A. C., Taddeo, F., Taylor, B., Blackwell, J. M., Tienari, P., Bramon, E., Tourbah, A., Brown, M. A., Tronczynska, E., Casas, J. P., Tubridy, N., Corvin, A., Vickery, J., Jankowski, J., Villoslada, P., Markus, H. S., Wang, K., Mathew, C. G., Wason, J., Palmer, C. N., Wichmann, H. E., Plomin, R., Willoughby, E., Rautanen, A., Winkelmann, J., Wittig, M., Trembath, R. C., Yaouanq, J., Viswanathan, A. C., Zhang, H., Wood, N. W., Zuvich, R., Deloukas, P., Langford, C., Duncanson, A., Oksenberg, J. R., Pericak-Vance, M. A., Haines, J. L., Olsson, T., Hillert, J., Iverson, A. J., De Jager, P. L., Peltonen, L., Stewart, G. J., Hafler, D. A., Hauser, S. L., McVean, G., Donnelly, P. and Compston, A. (2011). Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. Nature **476** (7359) 214-9

Schluesener, H. J., Sobel, R. A., Linington, C. and Weiner, H. L. (1987). A monoclonal antibody against a myelin oligodendrocyte glycoprotein induces relapses and demyelination in central nervous system autoimmune disease. J Immunol **139** (12) 4016-21

Schmidt, H., Williamson, D. and Ashley-Koch, A. (2007). HLA-DR15 haplotype and multiple sclerosis: a HuGE review. Am J Epidemiol **165** (10) 1097-109

Serafini, B., Rosicarelli, B., Magliozzi, R., Stigliano, E. and Aloisi, F. (2004). Detection of ectopic B-cell follicles with germinal centers in the meninges of patients with secondary progressive multiple sclerosis. Brain Pathol **14** (2) 164-74

Shulman, M., Wilde, C. D. and Kohler, G. (1978). A better cell line for making hybridomas secreting specific antibodies. Nature **276** (5685) 269-70

Soldan, S. S., Leist, T. P., Juhng, K. N., McFarland, H. F. and Jacobson, S. (2000). Increased lymphoproliferative response to human herpesvirus type 6A variant in multiple sclerosis patients. Ann Neurol **47** (3) 306-13

Sommer, N., Zipp, F., Rosener, M., Dichgans, J. and Martin, R. (1996). [Influence of genetic factors on multiple sclerosis]. Nervenarzt **67** (6) 457-64

- Sospedra, M. and Martin, R. (2005). Immunology of multiple sclerosis. Annu Rev Immunol **23** 683-747
- Sprent, J. and Surh, C. D. (2002). T cell memory. Annu Rev Immunol **20** 551-79
- Stavnezer, J. (1996). Immunoglobulin class switching. Curr Opin Immunol **8** (2) 199-205
- Steinman, L. (1996). Multiple sclerosis: a coordinated immunological attack against myelin in the central nervous system. Cell **85** (3) 299-302
- Storch, M. K., Piddlesden, S., Haltia, M., Iivanainen, M., Morgan, P. and Lassmann, H. (1998). Multiple sclerosis: in situ evidence for antibody- and complement-mediated demyelination. Ann Neurol **43** (4) 465-71
- Su, X. M. and Sriram, S. (1992). Analysis of TCR V beta gene usage and encephalitogenicity of myelin basic protein peptide p91-103 reactive T cell clones in SJL mice: lack of evidence for V gene hypothesis. Cell Immunol **141** (2) 485-95
- Sun, D., Whitaker, J. N., Huang, Z., Liu, D., Coleclough, C., Wekerle, H. and Raine, C. S. (2001). Myelin antigen-specific CD8⁺ T cells are encephalitogenic and produce severe disease in C57BL/6 mice. J Immunol **166** (12) 7579-87
- Szabo, S. J., Kim, S. T., Costa, G. L., Zhang, X., Fathman, C. G. and Glimcher, L. H. (2000). A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. Cell **100** (6) 655-69
- Tran, E. H., Prince, E. N. and Owens, T. (2000). IFN-gamma shapes immune invasion of the central nervous system via regulation of chemokines. J Immunol **164** (5) 2759-68
- Tubridy, N., Behan, P. O., Capildeo, R., Chaudhuri, A., Forbes, R., Hawkins, C. P., Hughes, R. A., Palace, J., Sharrack, B., Swingle, R., Young, C., Moseley, I. F., MacManus, D. G., Donoghue, S. and Miller, D. H. (1999). The effect of anti-alpha4 integrin antibody on brain lesion activity in MS. The UK Antegren Study Group. Neurology **53** (3) 466-72

Tuohy, V. K., Lu, Z., Sobel, R. A., Laursen, R. A. and Lees, M. B. (1989). Identification of an encephalitogenic determinant of myelin proteolipid protein for SJL mice. J Immunol **142** (5) 1523-7

Tuohy, V. K., Sobel, R. A. and Lees, M. B. (1988). Myelin proteolipid protein-induced experimental allergic encephalomyelitis. Variations of disease expression in different strains of mice. J Immunol **140** (6) 1868-73

Tzartos, S., Hochschwender, S., Vasquez, P. and Lindstrom, J. (1987). Passive transfer of experimental autoimmune myasthenia gravis by monoclonal antibodies to the main immunogenic region of the acetylcholine receptor. J Neuroimmunol **15** (2) 185-94

Uchida, J., Hamaguchi, Y., Oliver, J. A., Ravetch, J. V., Poe, J. C., Haas, K. M. and Tedder, T. F. (2004). The innate mononuclear phagocyte network depletes B lymphocytes through Fc receptor-dependent mechanisms during anti-CD20 antibody immunotherapy. J Exp Med **199** (12) 1659-69

van Meerwijk, J. P., Marguerat, S., Lees, R. K., Germain, R. N., Fowlkes, B. J. and MacDonald, H. R. (1997). Quantitative impact of thymic clonal deletion on the T cell repertoire. J Exp Med **185** (3) 377-83

Vandenbark, A. A. and Hinrichs, D. J. (1974). Experimental allergic encephalomyelitis and cellular immunity in the Lewis rat. Cell Immunol **12** (1) 85-93

von Boehmer, H. (2005). Mechanisms of suppression by suppressor T cells. Nat Immunol **6** (4) 338-44

Wandinger, K., Jabs, W., Siekhaus, A., Bubel, S., Trillenber, P., Wagner, H., Wessel, K., Kirchner, H. and Hennig, H. (2000). Association between clinical disease activity and Epstein-Barr virus reactivation in MS. Neurology **55** (2) 178-84

Wang, L. Y. and Fujinami, R. S. (1997). Enhancement of EAE and induction of autoantibodies to T-cell epitopes in mice infected with a recombinant vaccinia virus encoding myelin proteolipid protein. J Neuroimmunol **75** (1-2) 75-83

Wardemann, H., Yurasov, S., Schaefer, A., Young, J. W., Meffre, E. and Nussenzweig, M. C. (2003). Predominant autoantibody production by early human B cell precursors. Science **301** (5638) 1374-7

Warnke, C., Stuve, O., Hartung, H. P., Fogdell-Hahn, A. and Kieseier, B. C. (2011). Critical appraisal of the role of fingolimod in the treatment of multiple sclerosis. Neuropsychiatr Dis Treat **7** 519-27

Weinstock-Guttman, B., Ransohoff, R. M., Kinkel, R. P. and Rudick, R. A. (1995). The interferons: biological effects, mechanisms of action, and use in multiple sclerosis. Ann Neurol **37** (1) 7-15

Weiß, C. (2010). Basiswissen medizinische Statistik, Springer. 199-202

Westall, F. C. and Thompson, M. (1977). Encephalitogenic regions for the Lewis rat within the myelin basic protein. Immunol Commun **6** (1) 13-21

Whitehead, T. P., Kricka, L. J., Carter, T. J. and Thorpe, G. H. (1979). Analytical luminescence: its potential in the clinical laboratory. Clin Chem **25** (9) 1531-46

Whitham, R. H., Jones, R. E., Hashim, G. A., Hoy, C. M., Wang, R. Y., Vandenbark, A. A. and Offner, H. (1991). Location of a new encephalitogenic epitope (residues 43 to 64) in proteolipid protein that induces relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis in PL/J and (SJL x PL)F1 mice. J Immunol **147** (11) 3803-8

Whitney, K. D. and McNamara, J. O. (1999). Autoimmunity and neurological disease: antibody modulation of synaptic transmission. Annu Rev Neurosci **22** 175-95

Wolf, S. D., Dittel, B. N., Hardardottir, F. and Janeway, C. A., Jr. (1996). Experimental autoimmune encephalomyelitis induction in genetically B cell-deficient mice. J Exp Med **184** (6) 2271-8

- Yamashita, M., Ukai-Tadenuma, M., Miyamoto, T., Sugaya, K., Hosokawa, H., Hasegawa, A., Kimura, M., Taniguchi, M., DeGregori, J. and Nakayama, T. (2004). Essential role of GATA3 for the maintenance of type 2 helper T (Th2) cytokine production and chromatin remodeling at the Th2 cytokine gene loci. J Biol Chem **279** (26) 26983-90
- Yang, X. O., Pappu, B. P., Nurieva, R., Akimzhanov, A., Kang, H. S., Chung, Y., Ma, L., Shah, B., Panopoulos, A. D., Schluns, K. S., Watowich, S. S., Tian, Q., Jetten, A. M. and Dong, C. (2008). T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma. Immunity **28** (1) 29-39
- Yong, T., Meininger, G. A. and Linthicum, D. S. (1993). Enhancement of histamine-induced vascular leakage by pertussis toxin in SJL/J mice but not BALB/c mice. J Neuroimmunol **45** (1-2) 47-52
- Zamvil, S., Nelson, P., Trotter, J., Mitchell, D., Knobler, R., Fritz, R. and Steinman, L. (1985). T-cell clones specific for myelin basic protein induce chronic relapsing paralysis and demyelination. Nature **317** (6035) 355-8
- Zamvil, S. S., Mitchell, D. J., Moore, A. C., Kitamura, K., Steinman, L. and Rothbard, J. B. (1986). T-cell epitope of the autoantigen myelin basic protein that induces encephalomyelitis. Nature **324** (6094) 258-60
- Zamvil, S. S., Mitchell, D. J., Powell, M. B., Sakai, K., Rothbard, J. B. and Steinman, L. (1988). Multiple discrete encephalitogenic epitopes of the autoantigen myelin basic protein include a determinant for I-E class II-restricted T cells. J Exp Med **168** (3) 1181-6
- Zamvil, S. S. and Steinman, L. (1990). The T lymphocyte in experimental allergic encephalomyelitis. Annu Rev Immunol **8** 579-621
- Zhou, D., Srivastava, R., Nessler, S., Grummel, V., Sommer, N., Bruck, W., Hartung, H. P., Stadelmann, C. and Hemmer, B. (2006). Identification of a pathogenic antibody

response to native myelin oligodendrocyte glycoprotein in multiple sclerosis. Proc Natl Acad Sci U S A **103** (50) 19057-62

Zinkernagel, R. M. and Doherty, P. C. (1997). The discovery of MHC restriction. Immunol Today **18** (1) 14-7

9 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrerinnen und Lehrer an der Philipps-Universität Marburg waren die Damen und Herren:

Arnold, Aumüller, Barth, Basler, Baum, Becker, Behe, Beyer, Bien, Cetin, Czubayko, Daut, Dodel, Gemsa, Gerdes, Görg, Gudermann, Hamer, Happle, Hebebrand, Heeg, Hemmer, Kern, Klenk, Klose, König, Koolman, Kretschmer, Krieg, Kuni, Lill, Lippert, Löffler, Löffler, Lohoff, Maier, Maisch, Moll, Moosdorf, Mutters, Neubauer, Oertel, Radsack, Renz, Röhm, Rompel, Rosenow, Rothmund, Schepelmann, Schnabel, Seitz, Slenczka, Sommer, Steininger, Stief, Stiletto, Sturm, Vogelmeier, Voigt, Weihe, Werner, Westermann, Wulff.

10 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei all denen bedanken, die mich bei meiner Dissertation unterstützt haben:

Meinem Doktorvater **Prof. Dr. Norbert Sommer** danke ich für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe sowie die Überlassung des Themas. Auf seine Unterstützung konnte ich mich jederzeit auch über größere räumliche Distanzen verlassen.

Herrn **Prof. Dr. Wolfgang H. Oertel**, Direktor der Klinik f. Neurologie des Universitätsklinikums Gießen und Marburg am Standort Marburg, danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der Laboreinrichtungen.

Herrn **Dr. Stefan Nessler** danke ich für die Betreuung meiner Dissertation, die Bereitstellung eines großartigen EAE-Modells, die geduldige Einführung in die Grundlagen der EAE und die vielen Gespräche, die den Verlauf der Arbeiten begleitet haben. Frau **Prof. Dr. Christine Stadelmann-Nessler** danke ich für die histopathologische Auswertung der Experimente sowie die Hilfe bei der Etablierung der Proteinextraktion aus ZNS-Gewebe.

Frau **Dr. Alwina Bittner** danke ich für die Unterstützung bei den Tierexperimenten sowie die unendlich vielen praktischen Hilfen im Laboralltag. Darüber hinaus danke ich ihr für die Gespräche, die mich auf der Hin- und Rückfahrt zum Tierstall für die faszinierende Bergwelt Kirgisiens und das alpine Wandern begeistert haben.

Frau **Dr. Sabine Cepok** danke ich für die Hilfe bei der Etablierung der Western Blots.

Herrn **PD Dr. Björn Tackenberg** danke ich für das Interesse an meiner Arbeit und die konstruktiven Anregungen, die zur Verbesserung des Versuchsablaufs wesentlich beigetragen haben.

Meinem Kommilitonen und Freund **Jens Kruth** danke ich für die vielen Stunden, die wir gemeinsam im Labor verbracht haben, die konstruktiven Gespräche und die Hilfe insbesondere in den schwierigen Phasen des Projektes.

Herrn **Prof. Dr. Franz Blaes** und Frau **Dr. Marlene Tschernatsch** danke ich für die Unterstützung in den Anfangszeiten der Antikörperaufreinigung.

Herrn **Dr. Martin Behe** und Frau **Birgit Herbst** danke ich für die großartige Zusammenarbeit im Labor der Klinik f. Nuklearmedizin, die meine wissenschaftliche Arbeit wesentlich geprägt hat.

Bei **Kerstin Schlegel** möchte ich mich für die großartige praktische Unterstützung im Labor bedanken.

Allen übrigen Mitarbeitern im neuroimmunologischen Labor möchte ich für die gute Arbeitsatmosphäre und für ihre Hilfsbereitschaft danken: **Sabine Anfimov, Rosi Burmester, Michael Happel, Annette Hehenkamp, Felix Gronen, Verena Grummel, Frank Lohmüller, Berit Rosche, Susanne Stei** und **Manuela Windholz**.

Den Mitarbeitern des wissenschaftlichen Labors der Frauenklinik – insbesondere Herrn **Achim Allmeroth** und Herrn **Prof. Dr. Sturm** – danke ich für die Unterstützung bei der Nutzung und Aufrüstung der Ultrazentrifuge.

Insbesondere in der Abschlussphase der Dissertation haben mich meine Freunde und Kollegen in Mainz und Berlin unterstützt: **Natascha Christel, Susanne Karbach, Aleksander Kubura, Joachim Makowski, Sebastian Reuter, Andrea Ruff** und **Kirsten Waterstraat**. Herrn **Dr. Jens Schlegel** möchte ich für seine geduldige und flexible Unterstützung bei der Urlaubsplanung danken, die für die nötigen Freiräume zur Fertigstellung meiner Doktorarbeit gesorgt hat. Meinem Mentor **PD Dr. Christian Taube** danke ich für die Aufnahme in seine Mainzer Arbeitsgruppe, in der ich meine in Marburg gewonnenen Kenntnisse weiter vertiefen durfte.

Mein größter Dank gilt **meinen Eltern**, deren uneingeschränkter Unterstützung ich mir während des Studiums und der Arbeit an der Dissertation immer sicher sein konnte und die somit wesentlich zu deren Gelingen beigetragen haben.

11 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Klonale experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis: Charakterisierung myelinspezifischer Antikörper in einem T_H2-induzieren adoptiven Transfermodell“ im Medizinischen Zentrum für Nervenheilkunde, Klinik für Neurologie unter der Leitung von Prof. Dr. med. N. Sommer ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Marburg, den 12.10.2011

12 Lebenslauf

Die Seite 102 enthält persönliche Daten, die nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung sind.